

Studien zu der thaumarchaealen Prolyl-Isomerase *NmPin* aus *Nitrosopumilus maritimus*

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.
der Fakultät für Biologie an der Universität Duisburg – Essen
vorgelegt von

Lukas Hoppstock

aus Essen im August 2016

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Zentrum für Medizinische Biotechnologie in der Abteilung für Strukturelle und Medizinische Biochemie der Universität Duisburg-Essen unter der Leitung von Prof. Dr. Peter Bayer sowie an einer anderen gleichwertigen Einrichtung durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Peter Bayer

2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Ehrmann

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Markus Kaiser

Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2016

Für Johanne

Abkürzungsverzeichnis

(m/v)	<i>mass per volume</i>
(v/v)	<i>volume per volume</i>
[¹³ C]	Isotopen-markierter Kohlenstoff
[¹⁵ N]	Isotopen-markierter Stickstoff
¹ H	Wasserstoff
<i>ad</i>	adjustiert
<i>Aqua bidest.</i>	Zweifach destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
CD	Circularer Dichroismus
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Da	Dalton
DTT _{ox}	<i>trans</i> -4,5-Dihydroxy-1,2-dithian
FID	<i>free induction decay</i>
FKBP	FK506-bindendes Protein
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
GST	Glutathion-S-transferase
HMQC	<i>heteronuclear multiple quantum coherence</i>
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
IP	Immunopräzipitation
k _{cat}	Geschwindigkeitskonstante der katalysierten Reaktion
K _M	Michaeliskonstante
KP _i	Kaliumphosphat
M	mol/l
MALDI	<i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MS	Massenspektrometrie
NaP _i	Natriumphosphat
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
N-Terminus	Amino-Terminus
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PDB ID	Identifikationsnummer der Proteindatenbank
PPIase	Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase
RMSD	<i>root mean square deviation</i>
sdPar	<i>single domain</i> Parvulin
TACK	Thaumarchaeota, Aigarchaeota, Crenarchaeota, Korarchaeota
Upm	Umdrehungen pro Minute

Abkürzungsverzeichnis

UV	Ultraviolettes Licht
VE	Vollentsalzt
Vis	Sichtbares Licht
WT	Wildtyp
Xaa	Beliebige Aminosäure im Dreibuchstaben-Code

Aminosäuren

Ala (A)	Alanin	Leu (L)	Leucin
Arg (R)	Arginin	Lys (K)	Lysin
Asn (N)	Asparagin	Met (M)	Methionin
Asp (D)	Aspartat	Phe (F)	Phenylalanin
Cys (C)	Cystein	Pro (P)	Prolin
Gln (Q)	Glutamin	Ser (S)	Serin
Glu (E)	Glutamat	Thr (T)	Threonin
Gly (G)	Glycin	Trp (W)	Tryptophan
His (H)	Histidin	Tyr (Y)	Tyrosin
Ile (I)	Isoleucin	Val (V)	Valin

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Auflistung von Parvulinstrukturen in der RCSB-Proteindatenbank.	13
Tabelle 2-1: Auflistung der verwendeten Chemikalien.	19
Tabelle 2-2: Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen.	22
Tabelle 2-3: Zusammensetzung verwendeter Nährmedien.	26
Tabelle 2-4: Verwendete Bakterienstämme	27
Tabelle 2-5: Liste der verwendeten Enzyme.	29
Tabelle 2-6: Liste der verwendeten Antikörper.	29
Tabelle 2-7: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.	29
Tabelle 2-8: Liste der verwendeten Kits.	30
Tabelle 2-9: Liste der verwendeten Geräte.	30
Tabelle 2-10: Liste der verwendeten Software	32
Tabelle 2-11: Verlauf der GST-Affinitätschromatographie.	37
Tabelle 2-12: Verlauf der Gelfiltration.	38
Tabelle 2-13: Zusammensetzung der 20 % (v/v)-SDS Gele.	38
Tabelle 2-14: Ansatz des Isomerase-Assays.	46
Tabelle 2-15: Ansatz der Nitritkonzentrationsbestimmung.	47
Tabelle 2-16: NMR-Probenzusammensetzung.	49
Tabelle 3-1: Sequenz- und Strukturvergleich verschiedener Parvulindomänen mit NmPin.	57

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Schematische Darstellung der Rolle von Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen (PPlasen) bezüglich der Isomerisierung von Peptidyl-Prolyl-Bindungen (Xaa-Pro) in Proteinen.	11
Abbildung 1-2: Proteinstrukturen von humanen Vertretern der vier bekannten PPlase-Typen in cartoon-Darstellung.	12
Abbildung 1-3: Strukturüberlagerungen von Parvulindomänen aus verschiedenen Organismen.	14
Abbildung 1-4: Bildgebende Aufnahmen des mesophilen Thaumarchaeoten <i>Nitrosopumilus maritimus</i> .	17
Abbildung 2-1: Verwendete Proteinmarker bei der SDS-PAGE.	21
Abbildung 2-2: Vektorkarte von <i>nmpin</i> in pET-41b(+).	28
Abbildung 3-1: Herstellung von rekombinantem NmPin.	52
Abbildung 3-2: Endogene Expression von NmPin in <i>N. maritimus</i> .	54
Abbildung 3-3: Isomeraseaktivität von NmPin.	55
Abbildung 3-4: NMR-Struktur von NmPin.	56
Abbildung 3-5: Elektrostatisches Oberflächenpotential von NmPin.	58
Abbildung 3-6: Katalytisches Zentrum von NmPin.	59
Abbildung 3-7: Substratbindung von NmPin.	60
Abbildung 3-8: Chemisches Sondieren des katalytischen Zentrums von NmPin.	61
Abbildung 3-9: Einfluss von Val61 auf Substratbindung und Isomeraseaktivität von NmPin.	63
Abbildung 3-10: Prochirale Methylgruppen des Val61 in NmPin.	64
Abbildung 3-11: Substratfixierung durch ein Methylgruppennetzwerk im aktiven Zentrum von NmPin.	65
Abbildung 3-12: Lipidbindung von NmPin.	67
Abbildung 3-13: Mikroskopie von präfixierten <i>N. maritimus</i> -Zellen.	69
Abbildung 3-14: Mikroskopie von nicht-präfixierten <i>N. maritimus</i> -Zellen.	70

Abbildung 3-15: Mikroskopie von nicht-präfixierten <i>N. maritimus</i> -Zellen in Niedrigsalzpuffer.	71
Abbildung 3-16: Untersuchungen von NmPin auf hypothetische Modifikationen.	73
Abbildung 4-1: Sequenzvergleich verschiedener Parvulindomänen.	75
Abbildung 4-2: Vergleich von NmPin mit hPar14.	76
Abbildung 4-3: Phylogenetische Verwandtschaft von Archaeen und Eukaryoten.	77
Abbildung 4-4: Mechanismus von PPlase-katalysierten Reaktionen.	79
Abbildung 4-5: Substratfixierung im aktiven Zentrum von PPlasen.	81
Abbildung 4-6: Mikroskopie des S-Layers von <i>N. maritimus</i> .	82
Abbildung 4-7: Lokalisierungsmodell von NmPin in <i>N. maritimus</i> .	84

Inhalt

1	EINLEITUNG	9
1.1	KINETIK DER PROTEINFALTUNG	9
1.2	PEPTIDYL-PROLYL-CIS/TRANS-ISOMERASEN	11
1.3	PARVULINE	13
1.3.1	<i>Phosphat-spezifische Parvuline</i>	14
1.3.2	<i>Phosphat-unabhängige Parvuline</i>	15
1.3.3	<i>Archaeale Parvuline</i>	16
1.4	ZIELSETZUNG	18
2	MATERIAL UND METHODEN	19
2.1	MATERIAL	19
2.1.1	<i>Chemikalien</i>	19
2.1.2	<i>Proteinmarker</i>	21
2.1.3	<i>Puffer und Lösungen</i>	22
2.1.4	<i>Nährmedien</i>	26
2.1.5	<i>Bakterienstämme</i>	27
2.1.6	<i>Plasmide</i>	28
2.1.7	<i>Enzyme und Antikörper</i>	29
2.1.8	<i>Verbrauchsmaterial und Kits</i>	29
2.1.9	<i>Geräte und Software</i>	30
2.2	METHODEN	33
2.2.1	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	33
2.2.2	<i>Mikrobiologische Methoden</i>	34
2.2.3	<i>Biochemische Methoden</i>	36
2.2.4	<i>Immunologische Methoden</i>	42
2.2.5	<i>Spektrometrische/Spektroskopische Methoden</i>	44
3	ERGEBNISSE	52
3.1	HERSTELLUNG VON REKOMBINANTEM PROTEIN IN <i>E. COLI</i>	52
3.2	<i>NMPIN</i> WIRD ENDOGEN IN <i>N. MARITIMUS</i> EXPRIMIERT	53
3.3	<i>NMPIN</i> IST EINE AKTIVE, SUBSTRATSELEKTIVE ISOMERASE	54
3.4	NMR-STRUKTUR VON <i>NMPIN</i>	56
3.5	SUBSTRATBINDUNGSTASCHE UND KATALYTISCHES ZENTRUM VON <i>NMPIN</i>	58

3.6	OBERFLÄCHENEXPONIERTE RESTE BEEINFLUSSEN SUBSTRATBINDUNG UND AKTIVITÄT	60
3.7	<i>NMPIN</i> BINDET AN LIPIDVESIKEL <i>IN VITRO</i>	66
3.8	<i>IN VIVO</i> IST <i>NMPIN</i> IN DER ZELLHÜLLE LOKALISIERT	68
3.9	<i>NMPIN</i> LIEGT IN DER ZELLE IN UNMODIFIZIERTER FORM VOR	71
4	DISKUSSION	74
4.1	<i>NMPIN</i> IST EIN AKTIVES, PHOSPHO-UNABHÄNGIGES <i>SINGLE DOMAIN</i> -PARVULIN	74
4.2	SUBSTRATE WERDEN ÜBER EIN HYDROPHOBES NETZWERK IN POSITION GEBRACHT	78
4.3	DER <i>S-LAYER</i> GIBT DIE ZELLFORM VON <i>N. MARITIMUS</i> VOR	81
4.4	<i>NMPIN</i> IST ZWISCHEN <i>S-LAYER</i> UND ZELLMEMBRAN LOKALISIERT	83
4.5	DIE FUNKTION VON <i>NMPIN</i>	85
5	AUSBLICK	87
6	ZUSAMMENFASSUNG/ABSTRACT	88
7	ANHANG	90
7.1	VERWENDETE PRIMER	90
7.2	PARAMETER FÜR VERWENDETE NMR-SPEKTREN	91
8	LITERATURVERZEICHNIS	92
9	DANKSAGUNG	105
10	LEBENS LAUF	106
11	EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNGEN	107

1 Einleitung

1.1 Kinetik der Proteinfaltung

Ein wichtiges Charakteristikum eines lebenden Systems ist die Fähigkeit, sich selbst zu organisieren und zu regulieren. Im Zentrum dieser biologischen Prozesse stehen Proteine, die nahezu alle molekularen Transformationen vermitteln und damit den zellulären Metabolismus definieren (1). Dabei ist die Faltung der Proteine in ihren nativen Zustand, ein Ensemble aus wenigen dreidimensionalen Strukturen, eng verknüpft mit der korrekten Ausübung der biologischen Aktivität (2, 3). Die Herausforderung an die Zellen, die konformationelle Integrität und Flexibilität der Gesamtheit aller Proteine, des Proteoms, unter akuten und langwierigen Belastungen aufrecht zu erhalten, ist eines der grundlegenden Probleme der Biologie und der Medizin, da Mängel in der Proteom-Homöostase (Proteostase) zur Entstehung von zahlreichen Erkrankungen führen können. Krankheiten, die auf die Fehlfaltung und/oder Aggregation von Proteinen zurückzuführen sind, sind häufig neurodegenerativer Natur (Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer), können jedoch auch andere Zell- oder Gewebetypen betreffen (Diabetes Typ 2, Zystische Fibrose, Kardiovaskuläre Erkrankungen, Krebs) (4).

In nahezu allen bekannten Fällen entspricht der native Zustand eines Proteins der unter physiologischen Bedingungen thermodynamisch stabilsten Struktur (2). Es wird heute davon ausgegangen, dass der jeweils stabilste Zustand aus der nahezu unerschöpflichen Anzahl an konformationellen Möglichkeiten in einem stochastischen *'trial and error'*-Verfahren gefunden wird, ohne dass eine bestimmte, festgelegte Faltungsreihenfolge eingehalten werden muss. Gerade die Dynamik und hohe konformationelle Fluktuation in ungefalteten oder teilgefalteten Polypeptiden ermöglicht, dass entfernt liegende Aminosäurereste in stabile Kontakte treten können (5–7). Auf diese Weise können sich spontan und an verschiedenen Positionen in der Polypeptidkette lokale Strukturelemente bilden. Einzelne α -Helices konnten sich in unter 100 ns bilden, β -Faltblätter in 1 μ s entstehen und einfache Proteine in unter 50 μ s vollständig in ihre native Struktur falten (8–11). Ein deutlich größeres Zeitfenster mit ~ 10 -100 s (12, 13) konnte für ein weiteres, Struktur-gebendes Element beobachtet werden, die Konformation der Peptidyl-Prolyl-Bindung (Xaa-Pro), die damit ein Geschwindigkeit-bestimmender Faktor für den gesamten Faltungsprozess ist (14, 15). Im Unterschied zu allen nicht-Prolin-Peptidbindungen, bei denen die *trans*-

Konformation gegenüber der *cis*-Konformation energetisch deutlich begünstigt ist, ist die Xaa-Pro-Bindung in *cis* und *trans* energetisch nahezu gleichwertig, abhängig von den Aminosäureresten vor (16) und nach dem Prolinrest. In einer Studie mit Tripeptiden konnten besonders hohe *cis*-Anteile für die Motive WPY (57,9 %), YPY (42,0 %), FPY (39,4 %) und GPY (34,5 %) bestimmt werden (17). Im nativen Zustand von Proteinen entscheiden darüber hinaus Wechselwirkungen mit räumlich benachbarten Gruppen, ob die *cis*- oder die *trans*-Konformation das stabilere Isomer ausbildet (18, 19). Studien zum *cis*-Anteil in 1435 nicht-redundanten Proteinen der Brookhaven Protein Datenbank zeigten, dass 43 % mindestens ein *cis*-Prolin enthalten (16) und etwa 5-7 % aller Prolylbindungen in Proteinen im nativen Zustand *cis*-ständig sind (20, 21). In ungefalteten, partiell gefalteten oder interagierenden Proteinen können Xaa-Pro-Bindungen entsprechend den temporären Wechselwirkungen in einem anderen als dem nativen Isomer fixiert vorliegen und verlangsamen damit den Faltungsprozess hin zu einer biologisch aktiven Struktur. Im Falle der Ribonuklease A (RNase A) gibt es vier Proline, von denen im nativen Zustand zwei als *cis* (Pro93, Pro114) und zwei als *trans* (Pro42, Pro117) vorkommen (22). Im entfalteten Zustand von RNase A wird hingegen ein heterogenes Gemisch aus 16 (2^4) *cis/trans*-isomeren Spezies beobachtet (19). Die Überführung von einem Konformer zum anderen besitzt aufgrund des partiellen Doppelbindungscharakters der Peptidbindung (23) eine hohe Aktivierungsenergie von $\sim 20 \text{ kcal mol}^{-1}$ (24–26), wodurch die großen Zeiträume der spontanen Isomerisierung zu Stande kommen. Dieser Prozess kann in biologischen Systemen durch die Anwesenheit von spezialisierten Enzymen, den Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPlasen; EC 5.2.1.8) um mehrere Zehnerpotenzen beschleunigt werden (27–29). Mit Hilfe der PPlasen kann der langsame Schritt der *cis/trans*-Isomerisierung in der *de novo*-Faltung von Proteinen katalysiert und darüber hinaus als intrinsischer Konformationsschalter genutzt werden (30). Damit steht den biologischen Systemen neben gut untersuchten Regulatoren wie posttranslationalen Modifikationen, allosterischer Regulation oder kontrolliertem Proteinabbau zusätzlich ein Isomer-spezifischer, regulatorischer Mechanismus zur Verfügung (31). Das jeweilige Populationsverhältnis von *cis* zu *trans* wird durch eine Interaktion mit der Umgebung der Xaa-Pro Bindung vorgegeben, welche bei der Mehrheit der bekannten *cis*-Proline in gut zugänglichen *bend*, *coil* oder *turn* Strukturen vorliegt (32, 33). Die strukturell unterscheidbaren Proteinkonformere *cis* und *trans* können in der Folge für zwei separate Sätze an Bindungspartnern und damit separate Stoffwechselwege

zugänglich sein (31). Die Rolle der PPIase besteht darin, die Wiederherstellung eines Gleichgewichtszustands zwischen *cis* und *trans* nach Änderung der Umgebung (z. B. Isomer-spezifische Interaktion) von einer Minutenskala auf eine Millisekundenskala zu beschleunigen (34) (Abbildung 1-1).

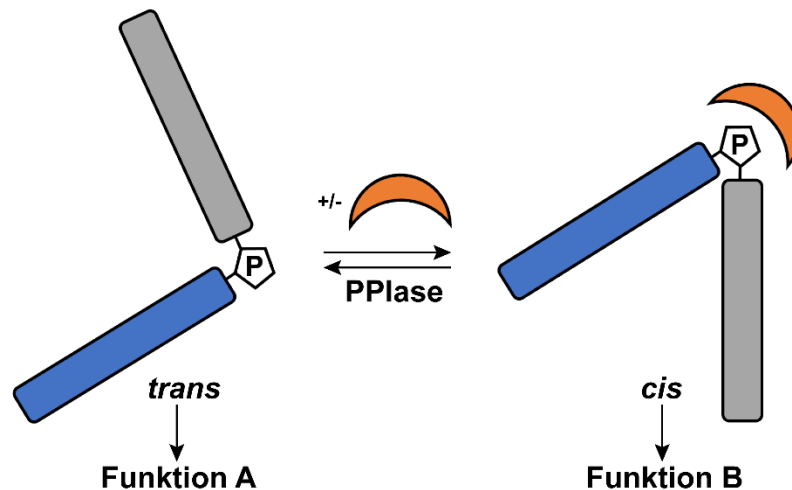


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung der Rolle von Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen) bezüglich der Isomerisierung von Peptidyl-Prolyl-Bindungen (Xaa-Pro) in Proteinen. Gezeigt ist ein vereinfachtes Protein mit zwei Strukturelementen (grau, blau), welche über eine Xaa-Pro Bindung (dargestellt als P) miteinander verbunden sind. Das jeweils stabilere Isomer, wie auch das Gleichgewicht zwischen *cis* und *trans*, wird durch die chemische Umgebung (intra- oder intermolekulare Wechselwirkungen, dargestellt als orangene Figur) der Xaa-Pro Bindung vorgegeben und bestimmt über die Faltung des Proteins die zelluläre Funktion. PPIasen katalysieren die Isomerisierung zwischen den Konformeren und beschleunigen die Umwandlung von einer Minutenskala auf eine Millisekundenskala.

1.2 Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen

Die Prolinhypothese, welche die Isomerisation der Peptidyl-Prolyl-Konformere als Geschwindigkeit-bestimmenden Schritt der Proteinfaltung bzw. –entfaltung postuliert, wurde bereits 1975 von Brandts *et al.* formuliert (14) und darüber hinaus spekuliert, dass es in der Zelle Enzyme geben muss, die diese Reaktion katalysieren.

Die erste Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase (PPIase), isoliert aus Schweinenieren, wurde 1984 in Zusammenhang mit der Entwicklung eines Assays zur Messung der *cis/trans*-Isomeraseaktivität beschrieben (35) und stellte sich später als Cyclophilin A heraus (36, 37) (Abbildung 1-2A). Cyclophiline, die erste Familie von PPIasen, sind in nahezu allen Organismen und allen subzellulären Kompartimenten zu finden (38) und haben als gemeinsames Merkmal die Bindung an das Immunsuppressivum CyclosporinA aus Schlauchpilzen (39), weshalb sie bis heute als therapeutisches Ziel, beispielsweise während und nach Organtransplantationen, Verwendung finden (vgl.

WHO, Essential Medicines, 2015). Die zweite PPlase-Familie wird durch FK506 bindende Proteine (FKBP) gebildet, von denen das erste Mitglied, FKBP12, 1989 beschrieben wurde (Abbildung 1-2B). FKBP sind wie Cyclophiline Immunophiline, da die Bindung an FK506 (Synonym: Tacrolimus, aus *Streptomyces tsukubaensis*) ebenfalls eine therapeutisch genutzte immunsuppressive Wirkung hat (40, 41). Beide Familien kommen als Eindomänenproteine (*single domain*, sd) und als Domänen in größeren Proteinen vor, besitzen darüber hinaus aber keine Ähnlichkeiten bezüglich Sequenz oder Struktur (38). Eine weitere Familie der PPlasen, die Parvuline (Abbildung 1-2C), wurde 1994 von Rahfeld *et al.* anhand eines 10 kDa-Proteins aus *Escherichia coli*, Par10, beschrieben, welches nicht an immunsuppressive Substanzen bindet und daher nicht den Immunophilinen zugeordnet werden konnte (42, 43). Die Bezeichnung Parvuline wurde entsprechend der kleinen Größe von Par10 an das lateinische Wort *parvulus* (Bed.: sehr klein, das Kleine) angelehnt. Neben den drei Familien Cyclophiline, FKBP und Parvuline wurde 2006 eine weitere strukturell nicht mit den anderen Gruppen verwandte humane PPlase identifiziert, der Protein-Ser/Thr-Phosphatase2A (PP2A)-Aktivator PTPA (Abbildung 1-2D) (44). Die Reaktivierung der Funktion von PP2A konnte auf die Mg^{2+} - und ATP- abhängige Katalyse der Isomerisierung des Pro190 durch PTPA zurückgeführt werden (45). Abgesehen von den zu PTPA homologen Proteinen Ypa1/Ypa2 aus *Saccharomyces cerevisiae* (46, 47), sowie Ypa1/Ypa2 aus *Schizosaccharomyces pombe* (48) wurden bisher keine weiteren Vertreter dieser PPlase-Familie identifiziert.

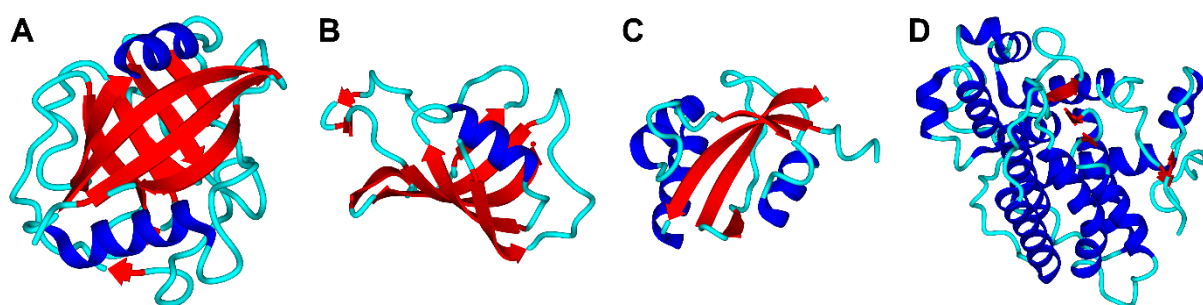


Abbildung 1-2: Proteinstrukturen von humanen Vertretern der vier bekannten PPlase-Typen in cartoon-Darstellung. (A) Cyclophilin A (PDB ID: 1CWA) (B) FKBP12 (PDB ID: 1FKT) (C) Par14 (PDB ID: 3UI4) (D) PTPA (PDB ID: 2IXM). Die Sekundärstrukturelemente α -Helix (blau), β -Faltblatt (rot) und *loop/turn*-Bereiche (cyan) sind entsprechend markiert.

1.3 Parvuline

In der Proteindatenbank (PDB) der Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) sind derzeit 13 Strukturen von Parvulinen hinterlegt, von denen neun aus Multidomänenproteinen stammen, welche neben einer oder mehreren Parvulindomänen weitere Domänen besitzen (Tabelle 1-1).

Tabelle 1-1: Auflistung von Parvulinstrukturen in der RCSB-Proteindatenbank.

Protein	Organismen	PDB ID	#Parvulindomänen/ #Domänen gesamt	Quelle
Pin1At	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1J6Y	1/1	(49)
PrsA	<i>Bacillus subtilis</i>	1ZK6	1/2	(50)
Ess1	<i>Candida albicans</i>	1YW5	1/2	(51)
PinA	<i>Cenarchaeum symbiosum</i>	2RQS	1/1	(52)
SurA	<i>Escherichia coli</i>	1M5Y	2/3	(53)
Par10	<i>Escherichia coli</i>	1JNS, 1JNT	1/1	(54)
PpiD	<i>Escherichia coli</i>	2KGJ	1/2	(55)
Pin1	<i>Homo sapiens</i>	1PIN, 1NMW	1/2	(56, 57)
Par14/17	<i>Homo sapiens</i>	1EQ3, 3UI4	1/2	(58, 59)
SurA	<i>Salmonella enterica</i>	4G2P	2/3	-
PrsA	<i>Staphylococcus aureus</i>	2JZV	1/2	(60)
Pin1	<i>Trypanosoma brucei</i>	2LJ4	1/1	(61)
Par45	<i>Trypanosoma brucei</i>	2MNT	1/2	-

Alle Parvulindomänen zeichnen sich durch eine charakteristische Kernfaltung, bestehend aus vier α -Helices und vier β -Faltblätter in der Reihenfolge β -3 α - β - α -2 β aus (von N- zu C-Terminus). Deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Parvulindomänen liegen in der Länge des *loop*-Bereichs zwischen β 1 und α 1 (Abbildung 1-3, rot markiert), welche mit der Erkennung von unterschiedlichen Substraten in Verbindung gebracht werden können. Über die Substrate lässt sich eine Unterteilung der Parvuline in zwei Gruppen vornehmen, Phosphat-spezifische PPlasen als Binder von Phosphoserin/-threonin(pSer/pThr)-Pro-Motiven (Abbildung 1-3A) und Phosphat-unabhängige PPlasen als Binder von nicht-phosphorylierten Xaa-Pro-Motiven (Abbildung 1-3B).

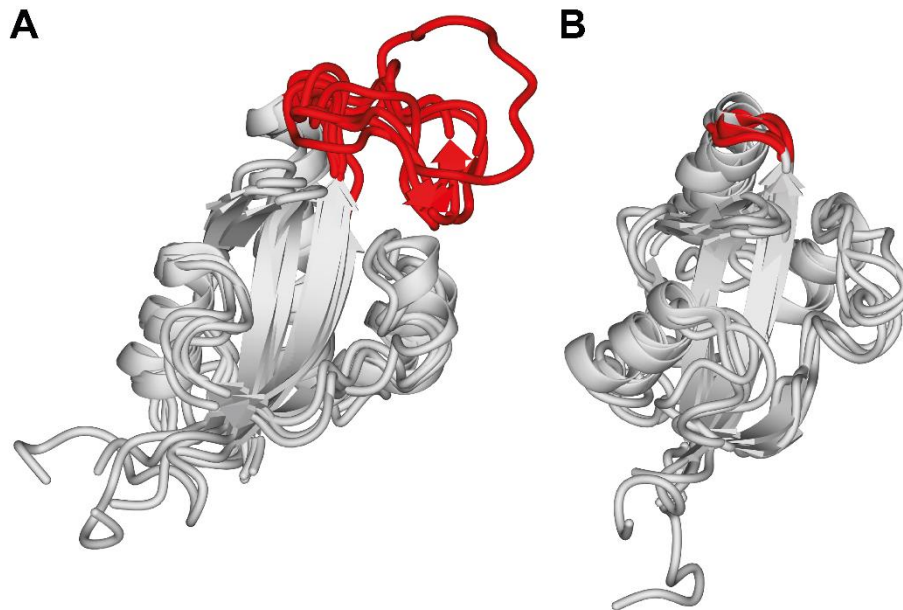


Abbildung 1-3: Strukturüberlagerungen von Parvulindomänen aus verschiedenen Organismen. (A) Überlagerung der Parvulindomänen der Phosphat-spezifischen Parvulinproteine Pin1At aus *Arabidopsis thaliana* (PDB ID: 1J6Y), Ess1 aus *Candida albicans* (PDB ID 1YW5), humanes Pin1 (PDB ID: 1NMW) und TbPin1 aus *Trypanosoma brucei* (PDB ID: 2LJ4). (B) Überlagerung der Parvulindomänen aus den Phosphat-unabhängigen Proteinen PrsA aus *Bacillus subtilis* (PDB ID: 1ZK6), CsPinA aus *Cenarchaeum symbiosum* (PDB ID: 2RQS), Par10 aus *Escherichia coli* (PDB ID: 1JNS) und humanes Par14 (PDB ID: 3UI4). In rot hervorgehoben ist der loop zwischen dem Faltblatt $\beta 1$ und der Helix $\alpha 1$.

1.3.1 Phosphat-spezifische Parvuline

Phosphat-spezifische Parvuline, wie das humane Pin1 (56, 62), TbPin1 aus *Trypanosoma brucei* (61), Pin1At aus *Arabidopsis thaliana* (49, 63, 64), sowie Ess1 aus *Candida albicans* (65, 51, 66) lassen sich ausschließlich in Eukaryoten finden. Der am besten untersuchte Vertreter dieser Gruppe ist das humane Pin1, welches nach seiner Interaktion mit der Kinase NIMA (*never in mitosis A*) in *Aspergillus nidulans* benannt wurde (**p**rotein **i**nteracting with **N**IMA). Die NIMA-Kinase wird benötigt, um die Mitose einzuleiten und durchzuführen (67–69), eine Verarmung an Pin1/Ess1 in HeLa und Hefe führt entsprechend zu einem mitotischen Arrest (70). Die Phosphorylierung von Ser/Thr-Pro-Motiven durch Prolin-abhängige-Kinasen wird in eukaryotischen Zellen als wichtiger Regulationsmechanismus verwendet und betrifft Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs), extrazelluläre Signal-regulierte-Kinasen (ERKs), Stress-aktivierte-Proteinkinasen (SAPKs), c-Jun-N-terminale-Kinasen (JNKs), p38-Kinasen, Glykogensynthase-Kinase-3 (GSK3) und Polo-ähnliche-Kinasen (PLKs), welche tief in zelluläre Prozesse wie Zellwachstum, Stressantwort, sowie Neuronenmetabolismus eingreifen. Damit spielt hPin1 eine entscheidende Rolle bei der Entstehungen von Krankheiten wie Krebs und Morbus Alzheimer (34, 71–78).

1.3.2 Phosphat-unabhängige Parvuline

Im Unterschied dazu zeigen Phosphat-unabhängige Parvuline, wie das humane Par14/17 (79, 58, 80–86) oder die prokaryotischen Vertreter PpiD und Par10 aus *Escherichia coli*, SurA aus *Escherichia coli* bzw. *Salmonella enterica* sowie PrsA aus *Bacillus subtilis* bzw. *Staphylococcus aureus* eine größere Heterogenität bezüglich potentieller Substrate (87–89, 50, 90–93). Par14 weist neben der Parvulindomäne N-terminal eine basische, unstrukturierte Erweiterung auf (58, 59), welche phosphorylierungsabhängig eine Lokalisation in den Zellkern (82), sowie eine Interaktion mit DNA (80, 86) und rRNA vermittelt (94). Abgesehen von einer Zellzyklus-abhängigen Interaktion mit DNA (86) und einer Interaktion mit dem Insulin-Rezeptorsubstrat1 (IRS-1) (95) ist die Funktion von Par14 kaum untersucht. Ähnlich verhält es sich für das humane Par17, welches wie Par14 von PIN4 kodiert und über eine alternative Initiation der Transkription exprimiert wird (83). Par17 ist in der mitochondrialen Matrix lokalisiert und interagiert ebenfalls mit DNA. Zudem scheint es an der Katalyse der Tubulinpolymerisation im Komplex mit Calmodulin beteiligt zu sein (96). Fraglich ist jedoch, welche Rolle die Parvulindomäne bei der zellulären Funktion der beiden Proteine spielt, da für Par14 im Vergleich zum bakteriellen Parvulin Par10 *in vitro* eine sehr schwache Isomeraseaktivität ermittelt werden konnte (79).

Eine vollständig inaktive Parvulindomäne ist für das periplasmatische Multidomänenprotein SurA aus *E. coli* beschrieben. SurA ist aus einer Chaperondomäne aufgebaut, die von zwei Parvulindomänen (Par1, Par2) unterbrochen wird, so dass N- und C-Terminus auf die Chaperondomäne entfallen (53). Der Name Sur (*survival*) wurde gewählt, da das Protein überlebensnotwendig für die stationäre Wachstumsphase von *E. coli* ist (97). Die Aktivität von SurA *in vivo* beinhaltet die korrekte Faltung und Reifung von zahlreichen Proteinen der äußeren Membran (*outer membrane proteins*, OMP), wie LamB, OmpA, OmpC und OmpF und gewährleistet damit die Integrität der Zellhülle (38, 98). Die Par1-Domäne ist katalytisch inaktiv (99), im Gegensatz dazu zeigt Par2 in Verbindung mit einer Chaperondomäne eine hohe *in vitro*-Aktivität bei der Rückfaltung von RCM-T1 mit einer Dissoziationskonstante von 1,2 μM (100). Beide Parvulindomänen sind jedoch an der Regulation von SurA beteiligt, indem Par1 und Par2 die Aktivität der Chaperondomäne inhibieren und je nach Mutation zu deutlichen Veränderungen im Phänotyp von *E. coli* führen (101). Ähnlich wie SurA, besteht die PPIase PpiD aus *E. coli* aus einer Chaperon- und einer katalytisch inaktiven Parvulindomäne, ist jedoch

mit einer N-terminalen Transmembranhelix in der inneren Membran verankert und ragt in den periplasmatischen Raum (102, 55). Studien zur Funktionalität zeigen eine mit SurA überlappende Substratspezifität als Chaperon, ohne dass einzelne OMP als Substrate ausgemacht werden konnten (88, 103). In Gram-positiven Bakterien wie *B. subtilis* und *S. aureus* konnte mit PrsA ebenfalls ein extrazelluläres Multidomänenprotein identifiziert werden, welches für die Reifung von sekretierten Proteinen zuständig (91, 104) und für *B. subtilis* überlebensnotwendig ist (105, 93). Die einzelne aktive Parvulindomäne ist in die Chaperondomäne, ähnlich wie bei SurA und PpiD, eingeschoben und das Protein über ein N-terminal gelegenes Cystein mit einem Lipidanker in der Zellmembran verankert (50, 60, 92). Die Funktionalität von PrsA wird vermutlich überwiegend von der Chaperondomäne bereitgestellt. Im Falle von *Listeria monocytogenes*, einem humanpathogenen Erreger, konnte jedoch gezeigt werden, dass für die vollständige Virulenz beide Domänen benötigt werden (106).

1.3.3 Archaeale Parvuline

Das erste putative Parvulin in Archaeen wurde 2011 mit PinA aus *Cenarchaeum symbiosum* strukturell beschrieben, nachdem 2006 mit *C. symbiosum* das erste vollständige Genom eines mesophilen/psychrophilen Crenarchaeoten sequenziert werden konnte (107). Im Vergleich mit humanen und bakteriellen Parvulinen deutet die Struktur auf ein Phosphat-unabhängiges Protein mit einem hoch flexiblen, funktionellen *loop* und einer stark vergrößerten Substratbindetasche hin (52). *C. symbiosum* wächst als Symbiont des marinen Schwamms *Axinella sp.* (108) und entzieht sich durch diese Lebensweise bis heute einer Reinkultur, so dass weitere funktionelle oder physiologische Studien zu crenarchaealen Parvulinen ausblieben. Zum Modellorganismus für mesophile Crenarchaeoten entwickelte sich stattdessen der Stamm SCM1 des Organismus *Nitrosopumilus maritimus*, welcher 2005 aus einem Meerwasseraquarium in Seattle in Reinkultur genommen (109) und dessen Genom 2010 vollständig sequenziert werden konnte (110). *N. maritimus* zählt zu den ersten und am besten untersuchten Ammonium-oxidierenden-Archaeen (AOA) und gehört als Mitglied der Gruppe I-Crenarchaeota zu einer der zahlenmäßig größten und Biomasse-reichsten Gruppe an marinem Bakterioplankton (111, 112). In Verbindung mit Untersuchungen zur Kinetik der Ammoniumoxidation ist heute davon auszugehen, dass AOA neben Ammonium-oxidierenden-Bakterien (AOB) maßgeblich am globalen Stickstoffkreislauf beteiligt sind (113–115).

N. maritimus zählt mit einer Größe von 0,5-0,9 μm Länge und 0,25 μm Breite zu den kleinsten freilebenden Organismen. Die Zellen besitzen im Durchschnitt ein Volumen von 0,023 μm^3 und sind, wie anhand von kryoelektronentomographischen Schnitten zu erkennen, frei von subzellulären Kompartimenten. Die Cytoplasmamembran ist von einer dichten, symmetrischen Proteinschicht umhüllt, welche frei von Peptidoglykan ist und im Unterschied zu AOB keinerlei Einstülpungen aufweist (116) (Abbildung 1-4).

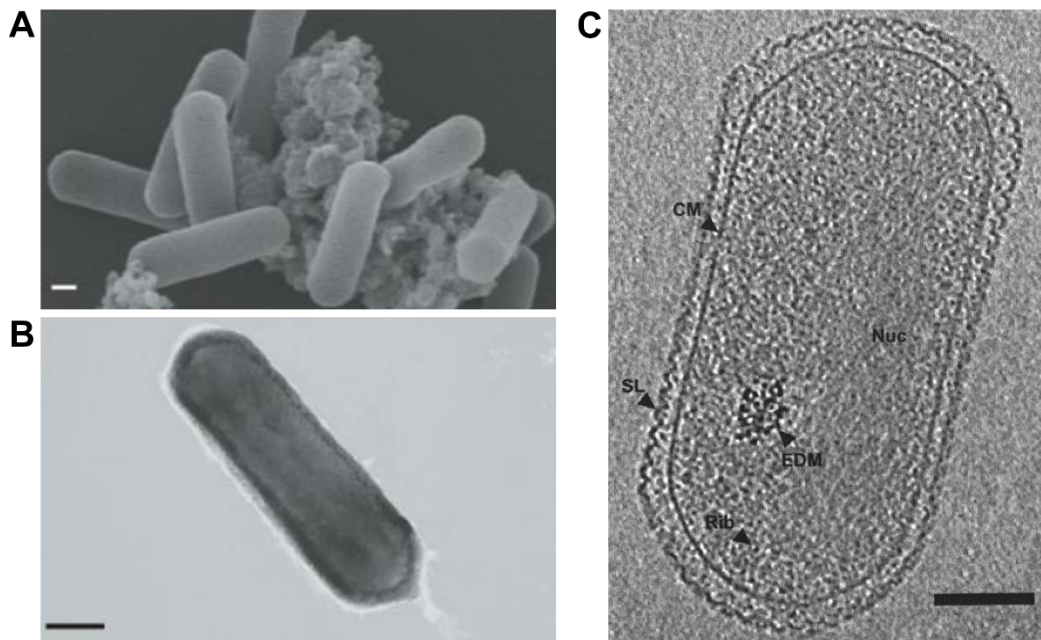


Abbildung 1-4: Bildgebende Aufnahmen des mesophilen Thaumarchaeoten *Nitrosopumilus maritimus*. (A) Rasterelektronenmikrograph von Au/Pd-zerstäubten Zellen (109). (B) Transmissionselektronenmikrograph einer Uranylacetat-gefärbten Zelle (109). (C) Kryoelektronentomographischer Schnitt einer *N. maritimus* Zelle. Annotiert ist der S-Layer (SL), die Cytoplasmamembran (CM), ein Ribosom (Rib), Elektronen-dichte Materie (EDM), sowie das Kernäquivalent (Nukleoid, Nuc) (116). Die gezeigten Größenmaßstäbe entsprechen 100 nm.

Die Gruppe der mesophilen/psychrophilen Crenarchaeota, zu denen *N. maritimus* und *C. symbiosum* zählen, unterscheiden sich in der genetischen Ausstattung deutlich von den hyperthermophilen Crenarchaeota, so dass für die mesophilen/psychrophilen Vertreter 2008 ein neues Phylum geschaffen wurde, die Thaumarchaeota (117). Diese phylogenetische Unterscheidung konnte auch in Hinblick auf putative PPlasen bioinformatisch bestätigt werden, da hyperthermophile Crenarchaeoten die Tendenz aufweisen, ihr PPlase-Repertoire zu reduzieren, so dass Parvulingene fast ausschließlich im Phylum Thaumarchaeota zu finden sind. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das Parvulingen innerhalb der Thaumarchaeota für ein putatives, hoch konserviertes *single domain* Parvulin (sdPar) kodiert, welches sich deutlich von

bakteriellen Parvulinproteinen unterscheiden lässt (118). Die physiologische Funktion dieser neuartigen Gruppe an kleinen Parvulinen, zu denen auch das strukturell bereits aufgeklärte PinA aus *C. symbiosum* gehört, wie auch deren zelluläre Lokalisation sind weiterhin unklar, weshalb sich die Studie eines sdPar aus dem kultivierbaren Modellthaumarchaeoten *N. maritimus* anbietet.

1.4 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit soll die putative sdPar Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase *NmPin* aus dem mesophilen Thaumarchaeoten *Nitrosopumilus maritimus* biochemisch und biophysikalisch charakterisiert werden, um Hinweise über die zelluläre Rolle von archaealen sdPar zu erlangen. Dazu soll zu Beginn die Kultivierung in *batch*-Kulturen, die Ernte und der schonende Zellaufschluss von *N. maritimus* laborintern etabliert werden, um die endogene Expression von *NmPin* zu untersuchen. Parallel dazu sollen die enzymatischen Eigenschaften von heterolog in *E. coli* exprimiertem, isoliertem und gereinigtem *NmPin* mit Hilfe verschiedener spektroskopischer Methoden, wie UV-Vis- und CD-Spektroskopie untersucht werden. Für ein detailliertes Bild zur Bindung von Modellsubstraten soll darüber hinaus die NMR-Spektroskopie zum Einsatz kommen, während strukturelle und mechanistische Hintergründe der vermuteten Isomeraseaktivität mit Hilfe von Mutationsstudien untersucht werden sollen. Die Ergebnisse aus den Studien an isoliertem Protein sollen anschließend mit der dreidimensionalen Struktur von *NmPin* (Dr. Christoph Lederer) verknüpft werden, um erste Hinweise auf eine mögliche Funktion des sdPar in *N. maritimus* zu gewinnen. Abschließend sollen zellbasierte Methoden wie die Fluoreszenzmikroskopie zum Einsatz kommen, um Erkenntnisse über den Wirkungsort von *NmPin* *in vivo* zu erlangen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

In Tabelle 2-1 sind die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien aufgelistet.

Tabelle 2-1: Auflistung der verwendeten Chemikalien.

Substanz	Abkürzung	Hersteller
[¹³ C]D-Glukose, 99-Atom% ¹³ C	[¹³ C]C ₆ H ₁₂ O ₆	Cortecnet, Voisins le Bretonneux
[¹⁵ N, ¹³ C]L-Valin, 98-Atom% ¹⁵ N/ ¹³ C		Cortecnet, V. le B.
[¹⁵ N] Ammoniumchlorid, 99-Atom% ¹⁵ N	[¹⁵ N]NH ₄ Cl	Cortecnet, V. le B.
1,4-Dithiothreitol	DTT	Roth, Karlsruhe
1-Butanthiol		Sigma-Aldrich, Steinheim
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	HEPES	Roth, Karlsruhe
2,2,2-Trifluorethanol	TFE	Fluka, Buchs
2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol	Tris	AppliChem, Darmstadt
2-Mercaptoethylamin		AlfaAesar, Massachusetts
3-(Trimethylsilyl)-1-propansulfonsäure	DSS	Aldrich, Steinheim
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	TMB	Sigma, Steinheim
4-Aminobenzensulfonamid	Sulfanilamid	Sigma-Aldrich, Steinheim
5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)	DTNB	AppliChem, Darmstadt
5-[(3a <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,6a <i>R</i>)-2-Oxohexahydro-1 <i>H</i> -thieno[3,4- <i>d</i>]imidazol-4-yl]pentansäure	D-Biotin	AppliChem, Darmstadt
Acetonitril	ACN	Fluka, Buchs
Acrylamid/Bisacrylamid Rotiphorese Gel 30	AA/Bis	Roth, Karlsruhe
Adenosin-5'-triphosphat Dinatriumsalz	ATP	Roth, Karlsruhe
Agar, Kobe I	Agar	Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid	NH ₄ Cl	Roth, Karlsruhe
Ammoniumcitrat Dibase	DAC	Fluka, Buchs
Ammoniumhydrogencarbonat	NH ₄ HCO ₃	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	APS	Roth, Karlsruhe
Antifoam 204		Sigma, Steinheim
Borsäure	H ₃ BO ₃	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau		Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid Dihydrat	CaCl ₂ * 2 H ₂ O	Roth, Karlsruhe
Cobaltchlorid Hexahydrat	CoCl ₂ * 6 H ₂ O	Fluka, Buchs
Coomassie Brilliant Blue G250		Sigma, Steinheim
Deuteriumoxid, 99,9 %	D ₂ O	Aldrich, Steinheim

D-Glukose	$C_6H_{12}O_6$	Roth, Karlsruhe
Dihydroxyacetophenon	DHAP	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dikaliumhydrogenphosphat	K_2HPO_4	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	Na_2HPO_4	AppliChem, Darmstadt
Eisen(III)citrate	Fe(III)citrat	Sigma, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure-	FeNaEDTA	AlfaAesar, Massachusetts
Eisennatriumsalz		
Essigsäure, 100 %		VWR, Pennsylvania
Ethanol		Fisher Chemical, Leics
Ethylendiamintetraessigsäure	EDTA	Roth, Karlsruhe
Fleischextrakt		Fluka, Buchs
Glycerol, 99 %		AppliChem, Darmstadt
Hefeextrakt		AppliChem, Darmstadt
Isopropanol		Fisher Chemical, Leics
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	IPTG	AppliChem, Darmstadt
Kaliumbromid	KBr	Fluka, Buchs
Kaliumchlorid	KCl	AppliChem, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	KH_2PO_4	Roth, Karlsruhe
Kaliumferrocyanid	$K_3[Fe(CN)_6]$	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kanamycinsulfat	Kan	Roth, Karlsruhe
Kupferchlorid Dihydrat	$CuCl_2 \cdot 2 H_2O$	Sigma, Steinheim
L-Glycin		AppliChem, Darmstadt
Lithiumchlorid	LiCl	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid Hexahydrat	$MgCl_2 \cdot 6 H_2O$	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat Heptahydrat	$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	Sigma-Aldrich, Steinheim
Manganchlorid Tetrahydrat	$MnCl_2 \cdot 4 H_2O$	Fluka, Buchs
Methanol		Roth, Karlsruhe
Milchpulver		Grema Reform
Natriumcarbonat	Na_2CO_3	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	NaCl	AppliChem, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	NaH_2PO_4	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat	SDS	AppliChem, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	$NaHCO_3$	Fluka, Buchs
Natriumhydroxid	NaOH	Bernd Kraft, Duisburg
Natriummolybdat Dihydrat	$NaMoO_4 \cdot 2 H_2O$	Roth, Karlsruhe
Natriumselenit Pentahydrat	$Na_2SeO_3 \cdot 5 H_2O$	Fluka, Buchs
Natriumthiosulfat	$Na_2S_2O_3$	Roth, Karlsruhe
Nickelchlorid Hexahydrat	$NiCl_2 \cdot 6 H_2O$	Roth, Karlsruhe
Orthophosphorsäure, 85 %	H_3PO_4	Roth, Karlsruhe
Pepton		Fluka, Buchs
Phenylmethylsulfonylfluorid	PMSF	AppliChem, Darmstadt

Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat	Tween20	AppliChem, Darmstadt
Rinderalbumin	BSA	Roth, Karlsruhe
Rinderhirnextrakt, Folch Fraktion I	BLE	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rubidiumchlorid	RbCl	Aldrich, Steinheim
Salzsäure, 37 %	HCl	Sigma-Aldrich, Steinheim
Schwefelsäure, 95 %	H ₂ SO ₄	Roth, Karlsruhe
Sibernitrat	AgNO ₃	Roth, Karlsruhe
Streptavidin-HRP-Konjugat		GE Healthcare, Buckinghamshire
Tetramethylethyldiamin	TEMED	Roth, Karlsruhe
Thiamin Hydrochlorid	Vitamin B1	Roth, Karlsruhe
Thioglycolsäure		AlfaAesar
<i>trans</i> -4,5-Dihydroxy-1,2-dithian	DTT _{ox}	Sigma, Steinheim
Trifluoressigsäure	TFA	Fluka, Buchs
Trypton		AppliChem, Darmstadt
Zinksulfat Heptahydrat	ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	Roth, Karlsruhe
α-Cyano-4-hydroxymzimtsäure	HCCA	Fluka, Buchs
α-Naphtylethyldiamindihydrochlorid	NEDA * 2 HCl	AppliChem, Darmstadt
β-Mercaptoethanol		Serva, Heidelberg
γ-L-Glutamyl-L-cysteinyl-glycin	Glutathion, GSH	AppliChem, Darmstadt

2.1.2 Proteinmarker

Als Proteinstandard bei der SDS-PAGE wurde der PageRuler Plus Prestained Protein Ladder oder der PageRuler Unstained BroadRange Protein Ladder (beide Thermo Scientific) verwendet (Abbildung 2-1).

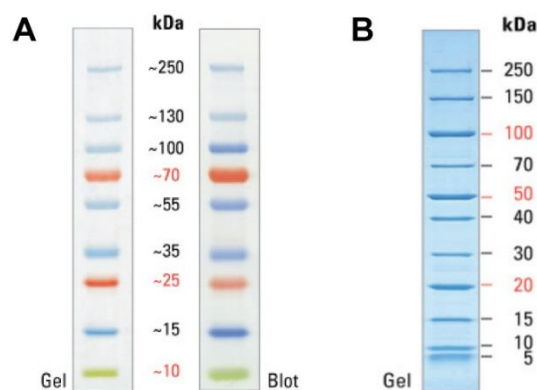


Abbildung 2-1: Verwendete Proteinmarker bei der SDS-PAGE. (A) PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). (B) PageRuler Unstained BroadRange Protein Ladder (Thermo Scientific).

2.1.3 Puffer und Lösungen

Im Folgenden sind die verwendeten Puffer und Lösungen aufgelistet (Tabelle 2-2). Der pH-Wert der Lösungen wurde bei Raumtemperatur eingestellt. Die wässrigen Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, durch Filtration (0,22 µm Sterilfilter, Millipore) sterilisiert.

Tabelle 2-2: Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen.

Lösung	Zusammensetzung	pH
10xPBS	323,8 ml 0,5 M Na ₂ HPO ₄ 76,2 ml 0,5 M NaH ₂ PO ₄ 87,66 g NaCl ad 1 l <i>Aqua bidest.</i>	7,4
Ammoniumlösung	1 M NH ₄ Cl (autoklaviert)	
Bicarbonatlösung	84 g NaHCO ₃ ad 1 l <i>Aqua bidest.</i> (autoklaviert)	
Borsäurelösung	100 mM Borsäure 0,2 mM EDTA	8,2
Bradford-Reagenz	100 mg Coomassie Brilliant Blue G250 50 ml Ethanol 100 ml 85 % Orthophosphorsäure ad 1 l <i>Aqua bidest.</i>	
Calciumchloridlösung	50 mM CaCl ₂ 10 mM RbCl 15 % (v/v) Glycerol 10 mM Tris	8,0
Carbonatpuffer	2,93 g NaHCO ₃ 1,59 g Na ₂ CO ₃ ad 1 l <i>Aqua bidest.</i>	9,6

Coomassielösung	1,25 g Coomassie Brilliant Blue G250 227 ml Ethanol 46 ml Essigsäure ad 500 ml <i>Aqua bidest.</i>	
DSS-Standard	50 mM KP_i 30 mM DSS	6,5
ELISA-Probenpuffer	PBS 300 mM Tris 0,25 % BSA	7,4
ELISA-Stoplösung	3,5 ml konzentrierte H_2SO_4 ad 50 ml <i>Aqua bidest.</i>	
Entfärbelösung	50 ml Essigsäure 75 ml Ethanol ad 1 l <i>Aqua bidest.</i>	
FeEDTA-Lösung	7,5 mM FeNaEDTA (autoklaviert, Lagerung bei 4 °C im Dunkeln)	
Fixierlösung	50 ml Methanol 5 ml Essigsäure ad 100 ml <i>Aqua bidest.</i>	
Gelfiltrationspuffer	150 mM NaCl 50 mM Tris	8,0
HEPES-Lösung	238 g HEPES ad 1 l <i>Aqua bidest.</i> (autoklaviert, Lagerung bei 4 °C im Dunkeln)	7,8
IPTG-Lösung	1 M Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid <i>Aqua bidest.</i>	
Kanamycin-Stammlösung	5 g Kanamycinsulfat ad 100 ml <i>Aqua bidest.</i>	
Laemmli-puffer	25 mM Tris 0,1 % (m/v) SDS	

	250 mM Glycin	
Lipidpuffer	20 mM Tris 150 mM NaCl 3 mM DTT	7,4
NMR-Puffer (KPi)	50 mM KH ₂ PO ₄ 50 mM K ₂ HPO ₄	6,5
PBS	1:9 Verdünnung von 10xPBS mit <i>Aqua bidest.</i>	7,4
PBST150	PBS 150 mM NaCl 0,1 % (v/v) Tween	8,0
PBST500	PBS 500 mM NaCl 0,1 % (v/v) Tween	8,0
Phosphatlösung	0,4 g KH ₂ PO ₄ ad 1 l <i>Aqua bidest.</i> (autoklaviert)	
PMSF	100 mM PMSF Isopropanol	
Sammelgellösung	500 mM Tris	6,8
SDS-Probenpuffer	12,5 ml Sammelgellösung 12,5 ml Glycerol 2,5 g SDS 1 mg Bromphenolblau 80 µl β-Mercaptoethanol	
Spurenelementlösung	100 mM HCl 0,5 mM MnCl ₂ Tetrahydrat 0,5 mM Borsäure 0,8 mM CoCl ₂ Hexahydrat 0,1 mM NiCl ₂ Hexahydrat 0,01 mM CuCl ₂ Dihydrat	

	0,5 mM ZnSO ₄ Heptahydrat 0,15 mM Na ₂ MoO ₄ Dihydrat (Lagerung bei 4 °C im Dunkeln)	
<i>Strep</i> -Elutionspuffer	100 mM Tris 150 mM NaCl 1 mM EDTA 50 mM D-Biotin	8,0
<i>Strep</i> -Waschpuffer	100 mM Tris 150 mM NaCl 1 mM EDTA	8,0
Sulfanilamidlösung	150 ml Orthophosphorsäure 10 g Sulfanilamide 0,5 g α-Naphtylethylendiamindihydrochlorid ad 1 l <i>Aqua bidest.</i> (Lagerung bei 4 °C im Dunkeln)	
Transferpuffer	20 mM Tris 192 mM Glycerol 20 % (v/v) Methanol	8,0
Trenngellösung	1,5 M Tris	8,8
TS2 (50x)	700 mg ZnSO ₄ Heptahydrat 30 mg MnCl ₂ Tetrahydrat 300 mg Borsäure 200 mg CoCl ₂ Hexahydrat 200 mg NiCl ₂ Hexahydrat 10 mg CuCl ₂ Dihydrat 900 mg Na ₂ MoO ₄ 20 mg Na ₂ SeO ₃ Pentahydrat ad 1 l <i>Aqua bidest.</i>	

2.1.4 Nährmedien

Im Folgenden sind die verwendeten Nährmedien aufgelistet (Tabelle 2-3). Der pH-Wert der Medien wurde mit pH-Teststreifen bei Raumtemperatur bestimmt.

Tabelle 2-3: Zusammensetzung verwendeter Nährmedien.

Medium	Zusammensetzung	pH
2xYT	16 g Trypton 10 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1 l <i>Aqua bidest.</i> nach dem Autoklavieren (ndAK) 40 mg Kanamycinsulfat	7,0
Agarplatten	500 ml LB 7,5 g Agar ndAK 500 µl Kanamycin Stammlösung	7,0
LB	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl ad 1 l <i>Aqua bidest.</i> ndAK 40 mg Kanamycinsulfat	7,0
M9	6,84 g Na ₂ HPO ₄ 3 g KH ₂ PO ₄ 0,5 g NaCl 1 g [¹⁵ N] NH ₄ Cl ad 1 l <i>Aqua bidest.</i> ndAK 2 ml MgSO ₄ (1 M) 2 ml TS2 (50x) 100 µl CaCl ₂ (1 M) 100 µl Vitamin B1 (0,5 % (m/v)) 1 ml Fe(III)Citrat (10 mM) 20 ml [¹³ C] Glukose (20 % (m/v)) 40 mg Kanamycinsulfat	

Nutrient	5 g Pepton 2 g Fleischextrakt ad 1 l <i>Aqua bideest.</i>	
SCM	26 g NaCl 5 g MgSO ₄ Heptahydrat 5 g MgCl ₂ Hexahydrat 1 g CaCl ₂ Dihydrat 0,1 g KBr ad 1 l <i>Aqua bideest.</i> ndAK 2 ml Bicarbonatlösung 2 ml HEPES-Lösung 10 ml Phosphatlösung 5 ml Spurenelementlösung 1 ml FeEDTA-Lösung 1 ml Ammoniumlösung	7,6
SOC	20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ Hexahydrat 10 mM MgSO ₄ Heptahydrat 20 mM Glukose ad 1 l <i>Aqua bideest.</i>	7,0

2.1.5 Bakterienstämme

In Tabelle 2-4 sind die verwendeten Bakterienstämme aufgelistet. Die Vervielfältigung von Plasmiden im Rahmen der *site directed* Mutagenese wurde in elektrokompenten Shox-Zellen durchgeführt, die Expression der Proteine erfolgte in dem chemokompenten Stamm BL21(DE3)T1r.

Tabelle 2-4: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Hersteller
Shox	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr</i> <i>hsdRMS</i> <i>mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>ara</i> Δ139 Δ(<i>ara</i> , <i>leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (<i>StrR</i>) <i>nupG</i> λ ⁻	Bioline, London

2.1.6 Plasmide

In dieser Arbeit wurde ein arbeitsgruppenintern modifizierter pET-41b(+)-Vektor (Merckbioscience) verwendet, mit dessen Hilfe *NmPin* als Fusionsprotein mit einem GST-*tag* exprimiert werden kann. Zwischen den beiden Proteinen befindet sich eine HRV 3C Schnittstelle, wodurch mit Hilfe der PreScission-Protease die GST entfernt werden kann (Abbildung 2-2).

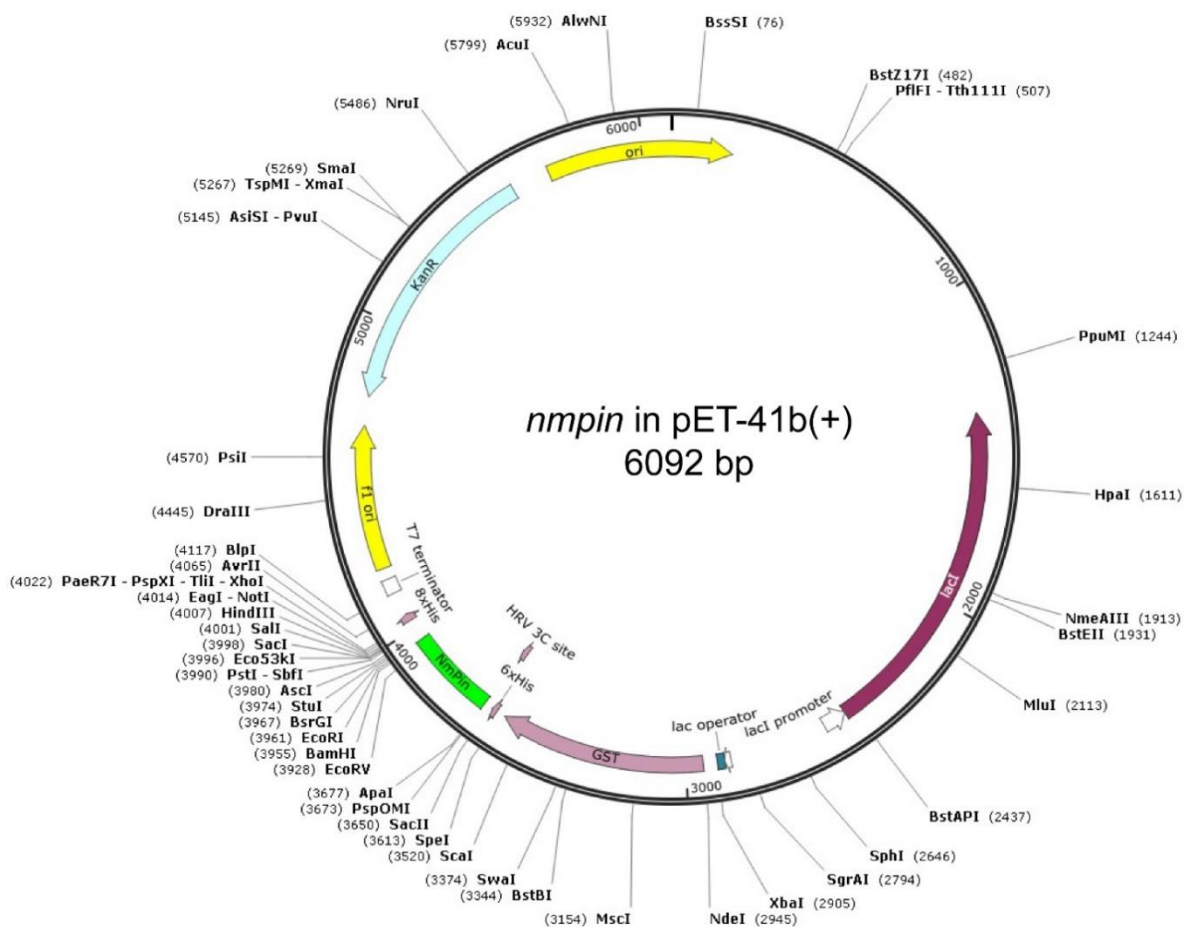


Abbildung 2-2: Vektorkarte von *nmpin* in pET-41b(+). Die Expression des Fusionsproteins GST-*NmPin* (altrosa und grün) steht unter der Kontrolle des lac-Operons. Die Proteine *NmPin* und GST sind über eine HRV 3C Schnittstelle miteinander verbunden, welche von der Protease PreScission geschnitten werden kann.

2.1.7 Enzyme und Antikörper

Im Folgenden sind die verwendeten Enzyme (Tabelle 2-5), sowie Antikörper (Tabelle 2-6) aufgelistet.

Tabelle 2-5: Liste der verwendeten Enzyme.

Enzym	Verwendung	Hersteller
Lysozym	Zellvorverdau	Fluka, Buchs
PreScission	Proteolyse des Fusionsprotein	eigene Herstellung
Trypsin	limitierte Proteolyse	Sigma-Aldrich, Steinheim
α -Chymotrypsin	Isomerase Assay	Sigma-Aldrich, Steinheim

Tabelle 2-6: Liste der verwendeten Antikörper.

Antigen	Ursprung	Eigenschaften/Verdünnung	Hersteller
NmPin	Kaninchen	polyklonal/ 1:1000, 1:50, 1:20	Eurogentec, Seraing
IgG Kaninchen	Maus	monoklonal, HRP-konjugiert/ 1:2000	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.8 Verbrauchsmaterial und Kits

Im Folgenden sind die verwendeten Gebrauchsmaterialien (Tabelle 2-7) und Kits (Tabelle 2-8) aufgeführt.

Tabelle 2-7: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Material	Hersteller
C18-Pipettenspitzen Supel-Tips	Supelco, Bellefonte
Dialyseeinheit Slide-A-Lyzer MINI 7000MWCO	Thermo Scientific, Massachusettes
Einmalküvette	Roth, Karlsruhe
Gelfiltrationssäule Superdex 75 pg, 16/600, 26/600	GE Healthcare, Little Chalfont
Glutathion Agarose Protino 4B	Macherey-Nagel, Düren
Handsäule Poly-Prep Chromatography Columns	BioRad, Berkeley
Magnetische <i>beads</i> MagStrep Typ2	Iba-lifesciences, Göttingen
Mikrotiterplatte Immulon 4 HBX	Thermo Scientific, Massachusettes
Nitrozellulosemembran Amersham Protran 0,2 μ m NC	GE Healthcare, Little Chalfont
NMR-Probenröhrchen 5 mm	Bruker, Fällanden
Petrischalen	Waldeck, Münster
Pipettenspitzen 10 μ l, 200 μ l, 1000 μ l	Sarstedt, Nümbrecht
ProteinA Sepharose CL-4B	GE Healthcare, Little Chalfont
Reaktionsgefäß 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Greiner bio-one, Essen

Röntgenfilm CL-Xposure	Thermo Scientific, Massachusettes
Sterilfilter 0,22 µm	Millipore, Tullagreen
Ultrazentrifugationsgefäß 1,5 ml	Beckmann Coulter, Palo Alto
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugationsfilter Vivaspin Turbo 15 5000MWCO	Sartorius, Göttingen

Tabelle 2-8: Liste der verwendeten Kits.

Kit	Hersteller
EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin	Thermo Scientific, Massachusettes
Plasmidpräparation NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel, Düren
Q5 Site-Directed Mutagenesis	New England Biolabs, Frankfurt am Main
QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis	Agilent, Santa Clara
SuperSignal West Femto	Thermo Scientific, Massachusettes

2.1.9 Geräte und Software

Im Folgenden sind verwendete Geräte (Tabelle 2-9) und in dieser Arbeit benötigte Software (Tabelle 2-10) aufgeführt.

Tabelle 2-9: Liste der verwendeten Geräte.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Blotapparatur	Fastblot B44	Biometra, Göttingen
Brutschränke	BD53	Binder, Tuttlingen
	IN 110	Memmert, Schwabach
CD-Spektroskop	J-710	Jasco, Gross-Umstadt
Elektroporationsgerät	MicroPulser Electroporator	BioRad, Berkeley
Elektroporationsküvetten	Gene Pulser/Micro Pulser 0,2 cm	BioRad, Berkeley
Feinwaagen	ABJ	KERN, Balingen-Frommern
	XS105 DualRange	Mettler Toledo, Gießen
FPLC-Anlagen	BioLogic DuoFlow F10	BioRad, Berkeley
	ÄKTA FPLC	GE Healthcare, Little Chalfont
	ÄKTA PrimePlus	
Großraumzentrifuge	Avanti JE, JLA 9.100	Beckmann, Palo Alto
Laborkarussell	Rotator SB2	Stuart, Staffordshire
Laborwaage	EG	KERN, Balingen-Frommern
Laborwippe	Duomax 1030	Heidolph, Schwabach
Magnetrührer	MR 3000	Heidolph, Schwabach
Magnetständer	MagnaRack	Invitrogen, Carlsbad

MALDI-TOF	Autoflex speed	Bruker, Fällanden
Massenspektrometer		
Mikrowelle		Sharp, Osaka
NanoDrop	ND 1000	Peqlab, Erlangen
NMR-Spektrometer	Ultrashield-700	Bruker, Fällanden
	Avance-400	
PCR-Gerät	T3000 Thermocycler	Biometra, Göttingen
pH-Meter	SevenEasy	Mettler Toledo, Gießen
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Plattenleser	SpectraMax M5e	Molecular Devices, Sunnyvale
Quarzküvetten	Suprasil 110-QS 1 mm, 2 mm	Hellma Analytics, Müllheim
	Suprasil 104-QS 10 mm	
Röntgenfilmentwickler	Cawomat 2000 IR	Cawo, Schrobenehausen
Scanner	Scanjet 8200	Hewlett Packard, Palo Alto
SDS-Gelapparatur	XCell Mini Protean 3	BioRad, Berkeley
Spannungsgeber	PowerPac basic	BioRad, Berkeley
	PowerPack P25T	Biometra, Göttingen
Sterilbank	HERA safe	Thermo, Langenselbold
Thermoschüttler	Thermoschüttler HAT	Infors, Bottmingen
Tisch-Thermoschüttler	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifugen	Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
	Centrifuge 5810R	
Ultraschallbad	Ultrasonic Cleaner	VWR, Pennsylvania
Ultraschallgerät	Sonoplus	Bandelin, Hamburg
Ultrazentrifugen	Optima LE-80K, Ti-45	Beckmann, Palo Alto
	Optima Max-XP, SS-34	
UV/Vis-Spektroskop	Cary 100Bio	Varian/Agilent, Santa Clara
Vakuumzentrifuge	Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Wasseraufbereitung	Milli-Q Biocel	Millipore, Schwalbach
<i>(Aqua bidest.)</i>		

Tabelle 2-10: Liste der verwendeten Software.

Software	Verwendung	Hersteller	Quelle
BioLogic	BioRad FPLC Programmierung	BioRad, Berkeley	-
BLAST	Online Suchwerkzeug über Sequenzhomologie	National Center for Biotechnology Information, Bethesda	-
Cary WinUV	UV/Vis-Spektrenaufnahme	Varian/Agilent, Santa Clara	-
CcpNmr Analysis	Auswertung von NMR-Spektren		(119, 120)
CSS-Palm	Vorhersage von Palmitoylierungsstellen		(121)
flexcontrol & flexanalysis 3.3	Massenspektren aufnehmen, auswerten	Bruker, Fällanden	-
GraphPad Prism	Statistik, Kurvenauswertung	GraphPad Software, La Jolla	-
ImageJ	Quantifizierung von Proteinbanden über Intensität		-
NEBaseChanger	Online Primerdesignwerkzeug	New England Biolabs, Ipswich	-
pSORTdb	Vorhersage von Proteinlokalisationen in Archaeen		(122)
Spectra Manager 1&2	CD-Spektrenaufnahme und Auswertung	Jasco, Groß-Umstadt	-
Topspin 3.0	NMR Spektrenaufnahme, Prozessierung, Phasenkorrektur	Bruker, Fällanden	-

Unicorn	ÄKTA FPLC Programmierung	GE Healthcare, Little Chalfont	-
WHAT IF/Yasara Twinset	Erstellung von Strukturmodellen, Strukturabgleich, Elektrostatik von Proteinen		(123–125)

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

Klonierung

Das Plasmid, welches für das Fusionsprotein GST-*NmPin* kodiert, lag bereits zu Beginn der Arbeit vor. Die Klonierung wurde von Alma Rute durchgeführt (siehe Dissertation Dr. Christoph Lederer).

Plasmidpräparation

Eine *E. coli* Kultur, welche das zu isolierende Plasmid trägt, wurde in 7 ml LB Medium über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden anschließend bei 4 °C und 4000 xg für 20 min pelletiert und nach den Instruktionen des NucleoSpin Plasmid Kits (Macherey-Nagel) präpariert. Die DNA wurde abweichend mit 30 µl *Aqua bidest.* eluiert und die Konzentration mittels NanoDrop1000 (Pepqlab) bestimmt.

Mutagenese

Der Austausch einzelner Aminosäuren in der Proteinsequenz erfolgte durch eine *site-directed* Mutagenese mit Hilfe des QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kits (Agilent) oder des Q5 Site-Directed Mutagenesis Kits (New England Biolabs). Das Design der Primer und die Durchführung der Mutagenese wurde nach den Instruktionen des jeweiligen Herstellers durchgeführt. 5 µl des Produkts wurden in 50 µl elektrokompente Shox-Zellen transformiert, auf einer Agarplatte mit 50 µg/ml Kanamycinsulfat ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit einigen Kolonien wurden Flüssigkulturen für Plasmidpräparationen angeimpft. Die Sequenzen der Mutanten wurden mit Sanger-Sequenzierung bestätigt (GATC GmbH).

2.2.2 Mikrobiologische Methoden

Herstellung kompetenter Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei *E. coli* Stämme verwendet, elektrokompente Shox-Zellen (Bioline) für die Präparation von Plasmiden sowie bei der *site-directed* Mutagenese und chemokompente BL21(DE3)T1r-Zellen (Sigma-Aldrich) zur Expression der Fusionsproteine.

Herstellung elektrokompenter Shox-Zellen

Eine Vorkultur Shox-Zellen in 50 ml Nutrient-Medium wurde ohne Antibiotikum bei 37 °C und 160 Upm über Nacht inkubiert und mit 5 ml eine 500 ml Nutrient Medium Hauptkultur angeimpft. Diese wurde bei 37 °C und 160 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 inkubiert, bevor sie für 15 min auf Eis ruhen gelassen wurden. Die Bakterien wurden anschließend für 15 min bei 4000 xg und 4 °C pelletiert und in 500 ml vorgekühltem *Aqua bidest.* resuspendiert. Die Suspension wurde erneut abzentrifugiert, bevor die Zellen in 250 ml kaltem *Aqua bidest.* aufgenommen wurden. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Bakterien in 20 ml 10 % (v/v) Glycerol resuspendiert, erneut pelletiert und zuletzt in 0,5 ml 10 % (v/v) Glycerol aufgenommen. In Aliquoten zu 50 µl wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Alle Schritte, mit Ausnahme des Zentrifugierens, wurden unter der Sterilbank durchgeführt.

Herstellung chemokompenter BL21(DE3)T1r-Zellen

Eine Vorkultur BL21-Zellen in 50 ml LB-Medium wurde ohne Antibiotikum bei 37 °C und 180 Upm über Nacht inkubiert. Eine 200 ml LB-Hauptkultur wurde mit 2 ml inokuliert und bei gleichen Bedingung bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert, bevor die Zellen für 5 min bei 3000 xg und 4 °C pelletiert wurden (Beschleunigung und Bremsen auf geringster Stufe). Das Pellet wurde in 45 ml vorgekühlter Calciumchloridlösung resuspendiert und für 30 min auf Eis ruhen gelassen. Anschließend wurden die Bakterien erneut pelletiert und in 2 ml Calciumchloridlösung aufgenommen. Die Zellen wurden in Aliquote zu je 50 µl in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert.

Transformation

Ein Aliquot elektrokompenter Shox-Zellen wurde auf Eis aufgetaut und mit 20 ng der isolierten DNA versetzt und gemischt. Der Ansatz wurde für eine Minute auf Eis

inkubiert, in eisgekühlte Elektroporationsküvetten überführt und die Bakterien mit der Einstellung EC2 elektroporiert (MicroPulser Electroporator, BioRad). Die Zellen wurden umgehend mit 200 µl vorgewärmtem SOC-Medium versetzt und für 60 min bei 37 °C und 300 Upm inkubiert. Im Anschluss wurden 50 µl Suspension (200 µl eines *site-directed* Mutagenese Reaktionsansatzes) auf einer Agarplatte mit 50 µg/ml Kanamycinsulfat ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Einzelne Kolonien wurden zur Herstellung von Flüssigkulturen verwendet.

Zur Transformation in den chemisch kompetenten Expressionsstamm BL21 wurde ein Aliquot Zellen auf Eis aufgetaut, sanft mit 50 ng DNA vermischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Darauf folgte ein Hitzeschock für 45 sec bei 42 °C, bevor die Bakterien erneut für 2 min auf Eis inkubiert wurden. Im Anschluss wurden die Zellen mit 200 µl raumtemperiertem LB-Medium versetzt und für 60 min bei 37 °C und 300 Upm kultiviert. Die Suspension wurde vollständig auf einer Agarplatte mit 50 µg/ml Kanamycinsulfat ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Eine beliebige Kolonie wurde zum Animpfen der Flüssigkulturen verwendet.

Proteinexpression

Die Proteinexpression erfolgte in dem *E. coli* Stamm BL21(DE3)T1r, welcher je nach Anforderung an das Protein in Vollmedium oder Minimalmedium mit Isotopen-markiertem Ammoniumsalz bzw. Isotopen-markierter Glukose kultiviert wurde.

Expression in Vollmedium

Die Expression von unmarkiertem Protein erfolgte in 2xYT-Medium, indem eine 20 ml Vorkultur mit einer Plattenkolonie angeimpft wurde und bei 37 °C und 180 Upm über Nacht inkubiert wurde. Mit 10 ml wurde eine 1 l Hauptkultur inokuliert und bei 37 °C und 180 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 kultiviert. Die Expression der Zielproteine wurde durch Zugabe von 200 µM IPTG induziert und erfolgte bei 25 °C und 160 Upm über Nacht. Die Zellen wurden bei 3660 xg und 4 °C für 20 min pelletiert, anschließend in 25 ml PBS (pH 8,0) resuspendiert und umgehend bei -20 °C eingefroren.

Expression in Minimalmedium

Für die Herstellung von Isotopen-markiertem Protein wurde eine 20 ml Vorkultur LB-Medium mit einer Plattenkolonie angeimpft und bei 37 °C und 180 Upm über Nacht

inkubiert. 2 ml dieser Kultur wurden in 1 l LB-Hauptkultur transferiert und die Bakterien weiter bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 kultiviert. Die Zellen wurden bei 4000 xg und 20 °C für 15 min abzentrifugiert, in 20 ml M9-Minimalmedium, supplementiert mit [¹⁵N]Ammoniumchlorid und/oder [¹³C]Glukose, resuspendiert und auf 2 l M9-Medium verteilt. Die Bakterien wurden anschließend bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 bei 37 °C und 180 Upm inkubiert und die Expression mit 200 µM IPTG induziert. Die Proteinexpression erfolgte bei 25 °C und 160 Upm über Nacht. Die Ernte der Bakterien wurde bei 3660 xg und 4 °C für 20 min durchgeführt und das Pellet anschließend in 25 ml PBS (pH 8,0) resuspendiert und bei -20 °C eingefroren.

Kultivierung und Ernte von *N. maritimus*

Der mesophile Thaumarchaeot *N. maritimus* wurde in 1 l Flaschen mit SCM-Medium in Dauerkultur gehalten und wöchentlich in frisches Medium mit 10 % Kultur inokuliert. Die Kultivierung erfolgte bei 28 °C im Dunkeln auf 1 mM anorganischem Ammonium. Das Wachstum wurde indirekt über die Konzentration von Nitrit verfolgt, welches als Stoffwechselprodukt aus der Oxidation von Ammonium hervorgeht (siehe Nitritkonzentrationsbestimmung). Die Zellen wurden bei einem Restammoniumgehalt von ca. 30 % ($A_{545} \approx 0,8$) durch Zentrifugation bei 4000 xg und 20 °C für 60 min geerntet. Das Pellet wurde in 200 µl PBS (pH 8,0) resuspendiert.

2.2.3 Biochemische Methoden

Zellaufschluss

Das Bakterienpellet wurde in einem handwarmen Wasserbad aufgetaut, mit 200 mg Lysozym, 0,01 % (v/v) Antifoam204 und 1 mM PMSF versetzt und für 60 min bei 4 °C vorsichtig gerührt. Die Suspension wurde auf Eis anschließend in fünf Zyklen für je 15 sec bei 60 % Intensität mittels Ultraschall aufgeschlossen. Zwischen den Zyklen wurde jeweils 1 min gewartet. Das Lysat wurde anschließend bei 4 °C und 95.800 xg für 60 min ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, durch eine 0,22 µm Membran filtriert, um Zellreste und Proteinaggregate zu entfernen und bis zur Affinitätschromatographie bei 4 °C gelagert.

Das Pellet von *N. maritimus* wurde in der Hand aufgetaut, mit einem Proteaseinhibitorcocktail (CompleteMini, Roche) nach Herstellerangaben versetzt und im eiskühlten Ultraschallbad für 45 min aufgeschlossen. Im Anschluss wurde das Lysat bei 4 °C und 100,000 xg für 60 min ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde

vorsichtig abgenommen, das Pellet im gleichen Volumen in PBS (pH 8,0) resuspendiert und die Proben bei 4 °C gelagert.

Proteinreinigung

Die Reinigung der Proteine erfolgte mittels FPLC-Anlage bei 5 °C über eine Affinitätschromatographie unter Verwendung eines GST-tags im Fusionsprotein, dem proteolytischen Entfernen der GST und einer anschließenden Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration). Dazu wurde die lösliche Zellfraktion nach dem Filtrieren auf eine äquilibrierte GSH-Agarose-Säule (Protino Glutathione Agarose 4B, Macherey-Nagel) gebracht, gewaschen und anschließend fraktionierend eluiert. Über den gesamten Verlauf wurde eine Flussrate von 1 ml/min verwendet und die Absorption bei 280 nm detektiert (Tabelle 2-11).

Tabelle 2-11: Verlauf der GST-Affinitätschromatographie.

Schritt	Puffer	#Säulenvolumen (=20 ml)
Äquilibration	PBS (pH 8,0)	2
Probenauftrag	PBS (pH 8,0)	4
Waschen1	PBS (pH 8,0)	2
Waschen2	PBS, 500 mM NaCl (pH 8,0)	2,5
Waschen3	PBS (pH 8,0)	2
Elution	PBS, 20 mM Glutathion (pH 8,0)	5

Die Protein-enthaltenden Fraktionen aus der Elution wurden vereint und die Menge an Fusionsprotein mittels Bradfordreaktion bestimmt. Im Anschluss wurde der GST-tag durch Zugabe von 1 µg PreScission-Protease pro mg Fusionsprotein über 5 h bei 4 °C proteolytisch von *NmPin* entfernt. Gleichzeitig wurde die Proteinlösung mit Hilfe eines Zentrifugationsfilters (Vivaspin Turbo 15, 5000 MWCO, Sartorius) auf 2 ml Endvolumen konzentriert (4 °C, 3220 xg). Die Lösung wurde anschließend für 10 min bei 4 °C und 16.000 xg geklärt und der Überstand mit einer Kanüle und 2 ml Spritze abgezogen. Mit der Probe wurde daraufhin eine 2 ml Probenschlaufe blasenfrei beladen und diese über eine äquilibrierte Gelfiltrationssäule (HiLoad 16/600 oder 26/600 Superdex 75 pg, GE Healthcare) getrennt. Der Lauf wurde bei einer Flussrate

von 0,5 ml/min vollständig fraktioniert und die Absorption bei 280 nm detektiert (Tabelle 2-12).

Tabelle 2-12: Verlauf der Gelfiltration.

Schritt	Puffer	#Säulenvolumen
Äquilibration	Gelfiltrationspuffer	1
Probenauftrag	Gelfiltrationspuffer	-
Elution	Gelfiltrationspuffer	1

Gemeinsam eluierte Fraktionen wurden anhand von Chromatogrammpopulationen vereint, zur Kontrolle der Molekülgröße und Reinheit mittels SDS-PAGE analysiert und benötigte Fraktionen mittels Zentrifugationsfilter (Vivaspin Turbo 15, 5000 MWCO, Sartorius) auf ein Endvolumen von 1 ml konzentriert (4 °C, 3220 xg). Nach Bedarf wurde das Zielprotein auf diese Weise in einen anderen Puffer überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 °C gelagert.

SDS-PAGE

Zur Auftrennung von Proteingemischen nach der Molekülgröße wurde eine diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt, bei der aufgrund der geringen Größe von *NmPin* Gele mit 20 % (v/v) Acrylamid verwendet wurden (126) (Tabelle 2-13).

Tabelle 2-13: Zusammensetzung der 20 % (v/v)-SDS Gele.

Reagenz	Trenngel (4x)	Sammelgel (4x)
Acrylamid/Bisacrylamid	13,33 ml	850 µl
<i>Aqua bidest.</i>	1,86 ml	3,5 ml
Trenngellösung	4,4 ml	0 ml
Sammelgellösung	0 ml	400 µl
SDS, 10 % (m/v)	200 µl	40 µl
APS, 10 % (m/v)	200 µl	40 µl
TEMED	8 µl	4 µl

Die Proteinproben (20 µl) wurden mit 5 µl Probenpuffer vermischt, für 10 min bei 95 °C denaturiert und bei Raumtemperatur für 2 min bei 8000 xg abzentrifugiert. Die Geltaschen wurden mit je 20 µl Probe bzw. 8 µl Proteinstandard beladen, eine Spannung von 120 V angelegt (PowerPac basic, BioRad). Die Spannung wurde entfernt, sobald sich der kleinste Größenmarker im unteren Fünftel des Gels befand (Xcell 3 Mini PROTEAN System, BioRad).

Coomassiefärbung

Das Gel wurde in die Coomassie-Färbelösung überführt, für 1 min in der Mikrowelle erhitzt und daraufhin für 10 min auf der Laborwippe geschwenkt (Duomax 1030, Heidolph). Anschließend wurde die Färbelösung abdekantiert und Entfärbelösung eingefüllt, welche erneut für 1 min in der Mikrowelle erhitzt und für weitere 10 min geschwenkt wurde. Daraufhin wurde die Entfärbelösung erneuert und zusammen mit Zellstoff (KIMWIPES Lite 200, Kimberly-Clark) über Nacht geschwenkt. Das vollständig entfärbte Gel wurde bis zum Scannen oder weiteren Gebrauch in VE-Wasser gelagert.

Silberfärbung

Die Proben aus der Immunopräzipitation wurden mit einer Silberfärbung nach Shevchenko *et al.* (127) sichtbar gemacht. Dazu wurde das Gel für 20 min in Fixierlösung inkubiert, für 10 min in 50 % (v/v) Methanol gewaschen und für 2 h mit wiederholtem Wasseraustausch in VE-Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Gel für 1 min in 0,02 % (m/v) Natriumthiosulfat inkubiert und zweimal für je 1 min mit VE-Wasser gewaschen. Darauf folgte ein Inkubationsschritt in 0,1 % (m/v) Silbernitrat für 20 min, gefolgt von einem Waschschrift in VE-Wasser für 1 min. Das Gel wurde in eine andere Plastikschiene überführt und erneut für 1 min mit VE-Wasser gewaschen. Die anschließende Farbreaktion wurde in Entwicklungslösung durchgeführt, bis die Banden der Elutionsspur deutlich sichtbar waren. Zur Beendigung der Färbung wurde der Lösung umgehend 5 % (v/v) Essigsäure zugesetzt, das Gel in frische 5 % (v/v) Essigsäure überführt und anschließend in 1 % (v/v) Essigsäure bei 4 °C gelagert.

Silberentfärbung

Um die Sensitivität der MALDI-TOF-Messung zu erhöhen, wurden vor dem Trypsinverdau die Silberionen aus der Gelbande entfernt (128). Dazu wurde die Bande

auf der Höhe des 10 kDa Proteinstandards in der Elutionsspur mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Das Gelstück wurde mit einer 1:1-Mischung aus frischem 30 mM Kaliumferrocyanid und 100 mM Natriumthiosulfat überschichtet und unter regelmäßigem Vortexen inkubiert, bis die Färbung verschwand. Anschließend wurde die Lösung entfernt, das Gelstück mehrfach mit *Aqua bidest.* gewaschen und für 20 min in 200 mM Ammoniumbicarbonat inkubiert. Diese Lösung wurde entfernt, das Gelstück mit einem Skalpell in kleine Stücke zerteilt und mehrfach mit *Aqua bidest.* gewaschen. Das restliche Wasser in den Gelstücken wurde durch mehrfache Inkubation in Acetonitril entfernt, bis das Gel milchig trüb erschien. Im Anschluss wurden die Gelstücke bis zur vollständigen Trockenheit im Vakuum bei 30 °C zentrifugiert (Concentrator 5301, Eppendorf).

Lipidsedimentationstest

Die Lipidbindung von *NmPin* Wildtyp, *NmPinK7E* und *NmPinK7E/K34E* wurde über die Sedimentation der Lipide untersucht (129, 130). Dazu wurde Rinderhirnextrakt (*brain lipid extract* (BLE), Folch fraction 1, Sigma-Aldrich) in Lipidbuffer suspendiert und unter kontinuierlichem Rühren verschiedene Konzentrationen angesetzt. Die Ansätze (40 µl) wurden mit 15 µM Protein versetzt und für 15 min bei 37 °C und 350 Upm inkubiert. Anschließend wurden die Lipide, gemeinsam mit Lipid gebundenen Proteinen, durch Ultrazentrifugation bei 4 °C und 100.000 xg für 60 min sedimentiert (1,5 ml Centrifuge Tubes, Beckmann). Der Überstand wurde umgehend vorsichtig abgenommen und das Pellet in einem äquivalenten Volumen Lipidpuffer resuspendiert. Beide Fraktionen wurden im Anschluss mittels SDS-PAGE analysiert.

Pulldown Experimente

Zur Untersuchung von posttranslationalen Modifikationen am Cys8 von *NmPin* wurden zwei Sonden verwendet, die den *N. maritimus*-Zelllysaten zugeben wurden, mittels Affinitätstags isoliert und anschließend mittels MALDI-TOF analysiert wurden. Als erste Sonde wurde 1 mM *NmPin*-GST mit einem Lysat aus 1 l *N. maritimus*-Kultur in PBS (pH 8,0) unter Zugabe von 1 mM ATP in einem Gesamtvolumen von 1 ml inkubiert. Der Ansatz wurde bei 4 °C und 20 Upm über Nacht rotiert, 30 µl sedimentierte GSH-Agarose-beads (Protino Glutathione Agarose 4B, Macherey-Nagel) zugesetzt, für 30 min bei 4 °C und 20 Upm inkubiert und bei 4 °C und 500 xg für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml PBS

gewaschen. Der Ansatz wurde erneut zentrifugiert (4 °C, 500 xg, 5 min) und resuspendiert. Auf diese Weise wurde das Pellet vier Mal gewaschen, bevor *NmPin* durch Zugabe von 5 µl PreScission-Protease (11 mg/ml) proteolytisch vom GST-tag getrennt wurde (4 °C, 5 h). Im Anschluss wurde bei 4 °C und 16.000 xg für 10 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und über eine 1 ml Probenschleife mittels fraktionierender Gelfiltration aufgetrennt. Die Fraktionen mit einer für *NmPin* typischen Retentionszeit wurden vereint, mittels Zentrifugationsfilter (Vivaspin Turbo 15, 5000 MWCO, Sartorius) auf ein Endvolumen von 100 µl konzentriert (4 °C, 3220 xg) und anschließend mittels MALDI-TOF analysiert. Als zweite Sonde wurde das synthetische Peptid KIKCSHILWSHPQFEK (Caslo, Kongens Lyngby) verwendet, welches die in *Thaumarchaea* konservierte Sequenz KIKCSHIL rund um das Cys8 enthält. Das Oktapeptid ist um einen *Strep-tag* (WSHPQFEK) verlängert, welcher mit hoher Affinität an *Strep*-Tactin bindet. Der Ansatz aus 1 mM Hexadecapeptid, 1 mM ATP in 1 ml *N. maritimus* Zelllysate aus 1 l Kultur in PBS (pH 8,0) wurde über Nacht bei 4 °C und 20 Upm rotiert. 80 µl (4 mg) MagStrep (magnetische Typ2 *Strep*-Tactin beads, iba) wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß in den Magnetständer (MagnaRack, Invitrogen) gestellt, um die beads zu sedimentieren. Daraufhin wurde der Überstand abgenommen und die MagStrep beads durch viermalige Wiederholung von Resuspendieren in 1 ml PBS (pH 8,0) und Sedimentieren gewaschen und äquilibriert. Im letzten Schritt wurde der Überstand verworfen, die MagStrep beads mit der Lysatprobe beladen und für 30 min bei 4 °C und 20 Upm inkubiert. Anschließend wurden die beads vier Mal magnetisch sedimentiert und jeweils mit 1 ml *Strep*-Waschpuffer resuspendiert. Im letzten Schritt wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 100 µl *Strep*-Elutionspuffer resuspendiert und mittels MALDI-TOF analysiert.

Chemisches Sondieren

Die Zugänglichkeit und Reaktivität des Cys8 wurde mit Hilfe von chemischen Sonden untersucht. Die Kinetik der jeweiligen Reaktion konnte gemessen werden, indem an das Cystein zuvor eine photometrisch aktive Abgangsgruppe eingeführt wurde. Dazu wurde ein Aliquot gereinigtes Protein in der Hand aufgetaut, mit einem zweifachen Überschuss an Ellmans-Reagenz (DTNB) in PBS (pH 8,0) versetzt und mit 200 µl Borsäurelösung (pH 8,2) auf ein Gesamtvolumen von 1 ml gebracht (131). Der Ansatz wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Absorption bei 412 nm gemessen. Der Überschuss an DTNB wurde mittels Zentrifugationsfilter

(Vivaspin Turbo 15, 5000 MWCO, Sartorius) in fünf Waschrissen mit PBS (pH 8,0) entfernt und die Probe auf ein Endvolumen von 500 µl eingengt (4 °C, 3220 xg). Anschließend wurde der Ansatz in eine Küvette überführt (Suprasil 104-QS, 10 mm, Hellma) mit 200 µl Borsäurelösung versetzt und die Reaktion durch Zugabe von zweifachem Überschuss an Thiolreagenz (1-Butanthiol, 2-Mercaptoethylamin, Thioglycolsäure) in einem Gesamtvolumen von 1 ml bei 20 °C gestartet. Der Reaktionsverlauf wurde über die Absorption bei 412 nm detektiert.

In-Gel Trypsinverdau

Die Proteine in den entfärbten, getrockneten Gelstückchen wurden mit 10 ng/µl Trypsin in 50 mM Ammoniumbicarbonat bei 37 °C über Nacht verdaut. Im Anschluss wurden die Peptidfragmente dreimal mit 20 µl 5 % (v/v) Trifluorethanol in 50 % (v/v) Acetonitril extrahiert und in der Vakuumzentrifuge (Concentrator 5301, Eppendorf) auf ca. 5 µl eingengt.

2.2.4 Immunologische Methoden

Western blot

Die Proben, bestehend aus den Zellfraktionen der *N. maritimus*-Lysate oder dem Produkt der Immunopräzipitation, wurden zunächst über eine SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine anschließend mittels *Semidry blot* für 30 min bei 80 mA (Power Pack P25 T, Biometra) auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham Protran 0,2 µm NC, GE Healthcare) transferiert. Nach dem Transfer wurden die freien Bindestellen auf der Membran unter Schwenken in PBST150 mit 3 % Milchpulver bei 4 °C über Nacht geblockt. Im Anschluss wurde einmal mit PBST500 und zweimal mit PBST150 für jeweils 10 min und Schwenken gewaschen. Die Inkubation mit dem Erstantikörper anti-*NmPin rabbit* IgG (Eurogentec) erfolgte in einer Verdünnung von 1:1000 in PBST150 mit 3 % Milchpulver für 3 h bei Raumtemperatur unter Schwenken. Nach weiteren Waschrissen mit PBST500 und PBST150 folgte die Inkubation mit einem Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugierten Zweitantikörper HRP-anti-*rabbit* IgG (Sigma) in einer Verdünnung von 1:2000 in PBST150 mit 3 % Milchpulver für 30 min bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurde erneut dreifach gewaschen, die Membran in eine Röntgenkassette überführt und mit dem Lumineszenzreagenz (SuperSignal West Femto, Thermo) für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssiges Reagenz wurde mit Zellstoff entfernt und anschließend die durch HRP katalysierte

Leuchtreaktion mit einem Röntgenfilm (CL-XPosure, Thermo) detektiert. Nach abgeschlossener Entwicklung und Fixierung (Cawomat) wurde der Röntgenfilm eingescannt.

Biotinylierung von anti-*NmPin*

Da für *NmPin* kein monoklonales Antikörperpaar vorhanden war, wurde für die Detektion im Rahmen des Sandwich-ELISA der gleiche polyklonale anti-*NmPin*-Antikörper biotinyliert. Die Biotinylierung erfolgte mit Hilfe des EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin Kit (Thermo) nach den Vorgaben des Herstellers. Im Anschluss wurde der Überschuss an Biotinylierungsreagenz durch zweifache Dialyse (1 h und über Nacht) in 1 l PBS (pH 7,4) mit Hilfe von Dialyseeinheiten (Slide-A-Lyzer MINI, 7000 MWCO, Thermo) entfernt. Darauf folgte eine Konzentrationsbestimmung mittels Nanodrop, eine 1:1 Verdünnung mit Glycerol, das Einfrieren in flüssigem Stickstoff und die anschließende Lagerung bei -20 °C.

Sandwich ELISA

Eine 96-well Mikrotiterplatte Immulon 4 HBX (Thermo Scientific, Rochester) wurde mit 50 µl anti-*NmPin*-Antikörper (10 µg/ml in Carbonatpuffer) je well beschichtet, mit Parafilm abgedeckt und bei 4 °C und 300 Upm über Nacht geschüttelt. Die wells wurden acht Mal mit je 300 µl PBS gewaschen und gründlich auf Zellstoff ausgeklopft. Zum Blocken wurde jedes well mit 300 µl 4 % BSA in PBS versetzt, mit Parafilm abgedeckt und für 1 h bei 37 °C und 300 Upm geschüttelt. Nach acht Waschschritten und Ausklopfen wie zuvor wurden jeweils 100 µl Probe (Verdünnungsreihe aus rekombinantem *NmPin* als Eichkurve oder *N. maritimus*-Lysate) in ELISA-Probenpuffer in die wells gegeben und bei 4 °C und 300 Upm über Nacht geschüttelt. Die wells wurden erneut in gleicher Weise gewaschen, jeweils 50 µl biotinylierter anti-*NmPin*-Antikörper (0,2 µg/ml in 0,5 % BSA in PBS) hinzugegeben, mit Parafilm abgedeckt und bei 37 °C für 1,5 h und 300 Upm geschüttelt. Im Anschluss an weitere Waschschrritte wurden die wells mit 50 µl Streptavidin-HRP-Konjugat (GE Healthcare, 1:500 verdünnt in 0,5 % BSA in PBS) beladen, mit Parafilm gedeckelt und bei Raumtemperatur und 300 Upm für 1,5 h im Dunkeln geschüttelt. Es folgten letzte Waschschrritte und Ausklopfen, bevor in jedes well 100 µl TMB-Lösung (Sigma-Aldrich) pipettiert und die Platte für 1 h dunkel gestellt wurde. Die Farbreaktion wurde

anschließend mit 50 µl ELISA-Stopplösung beendet und die Absorption jedes *well*s im Plattenleser (SpectraMax M5^e, Molecular Devices) bei 450 nm gemessen.

Immunopräzipitation

An Sepharose gebundenes Protein A (Protein A Sepharose CL-4B, GE Healthcare) wurde mit 0,2 g/ml in *Aqua bidest.* quellen gelassen, mit dem 40-fachen Volumen über eine Handsäule (Poly-Prep Chromatography Columns, BioRad) gespült und anschließend in 20 % (v/v) Ethanol bei 4 °C gelagert. Vor dem Gebrauch wurden die *beads* mit dem zehnfachen Volumen PBS (pH 8,0) äquilibriert. Das *N. maritimus*-Zelllysate, bestehend aus löslicher und unlöslicher Zellfraktion, wurde mit PBS (pH 8,0) auf ein Gesamtvolumen von 1 ml verdünnt und mit 30 µl sedimentierten Protein-A-Sepharose-*beads* versetzt und für 1,5 h bei 4 °C und 20 Upm rotiert. Der Ansatz wurde im Anschluss bei 4 °C und 16.000 xg für 10 min zentrifugiert, das Pellet mit den *beads* verworfen und von dem Überstand 20 µl für eine SDS-Probe entnommen. Dem restlichen Überstand wurden 2,5 µg anti-*NmPin*-Antikörper zugesetzt und der Ansatz bei 4 °C und 20 Upm über Nacht inkubiert. Daraufhin wurde eine weitere SDS-Probe entnommen, die *beads* bei 4 °C und 500 xg für 2 min sedimentiert und anschließend viermal mit 1 ml PBS und einmal mit 100 µl PBS gewaschen, wovon jeweils eine weitere SDS-Probe entnommen wurde. Von dem Ansatz wurden 30 µl entnommen und zur Elution vorsichtig mit 6 µl Probenpuffer vermischt. Anschließend wurde ein weiteres Mal bei 4 °C und 500 xg für 2 min zentrifugiert und 20 µl als SDS-Probe entnommen. Alle Proben wurden über eine SDS-PAGE getrennt und die Proteinbanden mittels Silberfärbung dargestellt. Sichtbare Banden in der Elutionsspur mit einer Molekülgröße entsprechend *NmPin* wurden ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und mittels MALDI-TOF analysiert.

2.2.5 Spektrometrische/Spektroskopische Methoden

Massenspektrometrie

Die Massenspektren wurden an einem MALDI-TOF Massenspektrometer (autoflex speed, Bruker) mittels positiver Ionisation im Reflektormodus aufgenommen. Weitere Einstellungen wurden je nach Größe der Zielmoleküle aus den Bruker Standardmethoden übernommen und die Sensitivität der Spektren über die Laserintensität sowie die Detektorspannung optimiert. Die Entsalzung der Proben aus Pufferlösungen erfolgte mittels C18-Matrix-beladenen Pipettenspitzen (Supel-Tips

C18, Supelco) nach den Vorgaben des Herstellers. Intakte Proteinproben wurden nach dem Entsalzen in eine Dihydroxyacetophenon-Matrix eingebettet. Messungen von Peptidproben wurden in einer α -Cyano-4-hydroxymizsäure-Matrix durchgeführt. Beide Ansätze erfolgten nach den Vorgaben zur Probenvorbereitung von Bruker. Im letzten Schritt wurden 0,5 μ l der jeweiligen Probe auf eine Probenplatte (MTP 384 target plate ground steel T F, Bruker) überführt und ruhen gelassen, bis die Lösungsmittel bei Raumtemperatur verdampft waren.

UV/Vis-Spektroskopie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die UV/Vis-Spektroskopie verwendet, um die Konzentration von bestimmten Molekülen in Lösungen zu bestimmen sowie zur Messung von Enzymkinetiken.

Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration nach der Affinitätschromatographie wurde mittels Bradford-Reaktion bestimmt (132). Dazu wurde das Photometer (BioPhotometer, Eppendorf) mit einer BSA-Verdünnungsreihe auf das Bradfordreagenz geeicht. Anschließend wurden 999 μ l Bradfordreagenz zur Bestimmung des Leerwerts in eine Küvette überführt, bevor 1 μ l Proteinprobe hinzu gegeben wurde. Der Ansatz wurde für 5 min inkubiert und im Anschluss die Proteinkonzentration, basierend auf der Absorption bei 595 nm, in mg/ml gemessen. Die Konzentration gereinigter Proteinproben wurde über die Absorption der aromatischen Aminosäuren bei 280 nm bestimmt. Dazu wurde zunächst die Absorption des jeweiligen Puffers bestimmt und als Leerwert von der Probenabsorption abgezogen. Die Konzentration wurde anschließend mit Hilfe des Lambert-Beer-Gesetzes berechnet. Der dazu benötigte Extinktionskoeffizient des jeweiligen Proteins wurde über die Summe an absorbierenden Einzelaminosäuren in der Sequenz mittels ProtParam (ExPASy, Swiss Institute of Bioinformatics) bestimmt.

Protease-gekoppelter Isomerase-Assay

Der Einfluss von *NmPin* auf die Isomerisierung von Substratpeptiden wurde in einem Protease-gekoppelten Isomerase-Assay untersucht (35, 133). Dazu wurden Modellpeptide mit dem Gerüst Succinyl-Ala-Xaa-Pro-Phe-*para*Nitroanilin (Suc-Ala-Xaa-Pro-Phe-*pNA*) verwendet, bei denen die Position Xaa N-terminal vom Prolin wie angegeben mit verschiedenen Aminosäuren besetzt wurde. Das jeweilige Peptid

(Caslo oder ChinaPeptides) wurde in einer Konzentration von 15 mM in 0,5 M Lithiumchlorid/2,2,2-Trifluoroethanol gelöst und über Nacht ruhen gelassen. In dem Peptidpuffer stellt sich ein Gleichgewicht mit ca. 40 % *cis*- und ca. 60 % *trans*-Isomer ein, welches sich in wässriger Lösung ohne Lithiumchlorid bei ca. 10 % *cis*- und 90 % *trans* befindet. Die Messungen erfolgten in einer 10 mm Quarzküvette (Suprasil 104-QS, Hellma) bei 390 nm, einer Spektralbandbreite von 1,0 nm und einem zeitlichen Mittelwert von 0,5 sec für jeden Datenpunkt. Um die thermische Isomerisierung zu minimieren, wurde die Messzelle auf 10 °C temperiert und mit Druckluft gespült, um Kondenswasserbildung an der Küvette zu verhindern. Folgender Ansatz wurde in der Küvette vorgelegt und für 5 min unter Detektion der Basislinie äquilibriert (Tabelle 2-14).

Tabelle 2-14: Ansatz des Isomerase-Assays.

Reagenz	Volumen (μ l)	Konzentration im Assay (μ M)
350 μ M α -Chymotrypsin in PBS (pH 6,8)	100	75
PPIase in PBS (pH 6,8)	X	0-2
PBS (pH 6,8)	885-X	-

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 μ l Peptid und Durchmischen des Ansatzes durch dreimaliges Schwenken der Küvette um $\sim 180^\circ$ gestartet und die Absorption für 15 min detektiert. Der Transfer des Peptids in die wässrige PBS-Lösung führt zu einer Änderung des Gleichgewichtszustands. Die Protease α -Chymotrypsin schneidet spezifisch das *trans*-Peptidisomer und verlagert das Gleichgewicht zusätzlich auf *trans*-Seite (134, 135). Die Reaktionsgeschwindigkeit der Proteolyse wird durch die Verfügbarkeit von *trans*-Substrat limitiert, welche von der Geschwindigkeit der Isomerisierung von *cis* zu *trans* bestimmt wird. Unter Abwesenheit einer Isomerase erfolgt die Isomerisierung ausschließlich thermisch, durch Zugabe einer PPIase wird dieser Schritt katalysiert.

Die Auswertung der Messkurven erfolgte über eine globale, biexponentielle Ausgleichskurve in GraphpadPrism. Dabei beschreibt die Geschwindigkeitskonstante k_{fast} den anfänglichen, steilen Kurvenabschnitt als die Verdaureaktion der initialen *trans*-Population, während die Geschwindigkeitskonstante k_{slow} die langsamere Isomerisierungsreaktion repräsentiert. Die Geschwindigkeitskonstante k_{fast} sowie der

Anteil der schnellen Reaktion an der Gesamtaborption %_{fast} wurde über die unkatalysierte (unter Abwesenheit von PPlase) Reaktion für jedes Substratpeptid bestimmt und für die Messungen mit unterschiedlichen PPlase-Konzentrationen konstant gehalten. Zur Berechnung der Geschwindigkeitskonstante k_{cat} der PPlase-katalysierten Reaktion wurde k_{slow} der unkatalysierten Reaktion (k_{uncat}) von der observierten k_{slow} der katalysierten Reaktion (k_{obs}) subtrahiert (Gleichung 1).

Gleichung 1: Berechnung der Geschwindigkeitskonstante k_{cat} für die katalysierte Reaktion.

$$k_{cat} = k_{obs} - k_{uncat}$$

Mit Hilfe der k_{cat} für verschiedene PPlase-Konzentrationen konnte die katalytische Effizienz k_{cat}/K_M des Enzyms für das jeweilige Substrat berechnet werden. In dem Bereich, in dem k_{cat} eine lineare Anhängigkeit zur PPlase Konzentration [PPlase] besitzt, gilt Gleichung 2 (85).

Gleichung 2: Berechnung der enzymatischen Effizienz k_{cat}/K_M (85).

$$\frac{k_{cat}}{K_M} = \frac{k_{cat}}{[PPlase]}$$

Nitritkonzentrationsbestimmung

Das Wachstum von *N. maritimus* wurde über die Nitritkonzentration verfolgt, welche durch die Oxidation von Ammonium im Rahmen des Stoffwechsels zunimmt (109). Dazu wurde folgender Ansatz in einer Einmalküvette vorgelegt (Tabelle 2-15).

Tabelle 2-15: Ansatz der Nitritkonzentrationsbestimmung.

Reagenz	Volumen (µl)
<i>N. maritimus</i> -Kultur	50
Sulfanilamidlösung	300
<i>Aqua bidest.</i>	1150

Die Lösung wurde für 10 min inkubiert und im Anschluss die Absorption bei 545 nm bei Raumtemperatur gemessen. Die Korrektur der Basislinie erfolgte mit SCM Medium

ohne *N. maritimus*. Eine Absorption von 1,2 entsprach einer Nitritkonzentration von 1 mM.

CD-Spektroskopie

Die CD (Circular Dichroismus)-Spektroskopie wurde verwendet, um die Faltung von Wildtyp *NmPin* mit verschiedenen Punktmutanten zu vergleichen und um die thermische Stabilität von Proteinen mit Hilfe von Schmelzkurven zu untersuchen. Alle Proben wurden in 20 mM NaPi (pH 7,4) mit 0,15 mg/ml Proteinkonzentration angesetzt. Die Messung der CD-Spektren erfolgte in einer 1 mm Küvette (Suprasil QS, Hellma) und einem Probenvolumen von 200 µl bei 20 °C. Bei einer Scangeschwindigkeit von 50 nm/min wurde mit einer Datenintegrationszeit von 1 sec alle 0,1 nm ein Datenpunkt aufgezeichnet. Abschließend wurden 50 Einzelspektren zu einem Summenspektrum akkumuliert. Die Aufnahme von Schmelzkurven wurde in 2 mm Küvetten (Suprasil QS, Hellma) mit 400 µl Probe, einer Heizrate von 1 °C/min und einem Temperaturintervall von 20-80 °C durchgeführt. Bei einer Wellenlänge von 222 nm wurde alle 0,2 °C ein Datenpunkt aufgenommen. Die Auswertung der Spektren erfolgte durch Umrechnen des CD Signals θ in Milligrad in die Mittlere Restelliptizität θ_{mrw} mit Hilfe der Gleichung 3.

Gleichung 3: Berechnung der Mittleren Restelliptizität.

$$[\theta]_{mrw} = \theta \cdot M_{mrw} / 10 \cdot c \cdot l$$

Dabei steht M_{mrw} für das Mittlere Aminosäurerestmolekulargewicht, welches mit Hilfe der Gleichung 4 berechnet werden konnte. Weiterhin steht c für die Konzentration der Proteinprobe und l für die Weglänge der Küvette.

Gleichung 4: Berechnung des Mittleren Restmolekulargewichts.

$$M_{mrw} = \frac{\text{Molekulargewicht}}{\#\text{Aminosäurereste}}$$

Zur besseren Vergleichbarkeit der Faltung der verschiedenen Proteinmutanten mit dem Wildtyp *NmPin* wurden alle Spektren auf das Wildtypspektrum normiert. Unter der

Annahme, dass innerhalb einer Schmelzkurve ein maximal negatives CD Signalplateau bei 222 nm das vollständig gefaltete Protein (100 %) und ein minimal negatives CD Signalplateau das vollständig entfaltete Protein (0 %) repräsentiert, wurde das Vorzeichen aller Messpunkte umgekehrt und der Datensatz auf den höchsten Datenpunkt normiert (100 % gefaltet), so dass die Faltung über die Temperatur dargestellt werden konnte.

NMR-Spektroskopie

Die Interaktion zwischen *NmPin* und dem Substratpeptid (Suc-Ala-Arg-Pro-Phe-*pNA*) bzw. dem Prolinanalogen *trans*-4,5-Dihydroxy-1,2-dithian (*DTT_{ox}*) wurde mit Hilfe von NMR-Titrationsexperimenten auf atomarer Ebene untersucht. Je nach Spektrenanforderung wurde Wildtyp *NmPin* oder Punktmutanten von *NmPin* mit Isotopen markiert. Dazu wurden vollständige [¹⁵N]- und/oder [¹³C]-Markierungen sowie [10 % ¹³C]-Markierungen verwendet (siehe Expression). Eine aliquotierte Proteinprobe wurde in der Hand aufgetaut und mit Hilfe eines Zentrifugationsfilters (Vivaspin Turbo 15, 5000 MWCO, Sartorius) in 50 mM KPi (pH 6,5) überführt (3660 xg, 4 °C). Dazu wurde die Probe fünf Mal 15-fach verdünnt und jeweils auf ihr ursprüngliches Volumen konzentriert. Anschließend wurde folgender Ansatz in einem 5 mm NMR-Röhrchen (Bruker) vorgelegt (Tabelle 2-16).

Tabelle 2-16: NMR-Probenzusammensetzung.

Reagenz	Volumen (µl)
Proteinprobe (~1 mM)	540
Deuteriumoxid, 99,9 %	60
DSS Standard (50 mM)	1

Die Messungen (¹H-¹⁵N-HSQC, ¹H-¹⁵N-SOFAST-HMQC, ¹H-¹³C-HSQC) erfolgten an einem Ultrashield-700 mit einem inversen Tripleresonanz-Cryo-Probenkopf sowie einem Avance-400 mit einem Tripleresonanz-Probenkopf (beide Bruker) bei 25 °C mit der Software Topspin 3.0 (Bruker). Alle verwendeten Pulsprogramme entstammten der Programmbibliothek von Bruker (Parameter siehe Anhang). Die Prozessierung der 2D-Spektren erfolgte mit dem Kommando *xfb*, gefolgt von einer automatischen Basislinienkorrektur in beiden Dimensionen mit Hilfe der Befehle *abs2.water* und *abs1*. Bei Bedarf wurde zudem eine manuelle Phasenkorrektur vorgenommen.

Im Anschluss an ein reines Proteinspektrum wurde der Ligand (15 mM Peptid oder 30 mM DTT_{ox}; beide 50 mM KPi, pH 6,5) schrittweise der Proteinlösung zugegeben und bei jedem Titrationsschritt ein weiteres Spektrum aufgenommen. Die Auswertung der chemischen Verschiebung einzelner Gruppen, Amide oder Methylgruppen, erfolgte durch Berechnung des Summenvektors der beiden Vektoren der ¹H- und der ¹⁵N- bzw. ¹³C-Verschiebung. Die unterschiedliche Gewichtung der Einzelvektoren wurde mit Hilfe des jeweiligen Gewichtungsfaktors ω korrigiert ($\omega_C = 0,189$ für Methylkohlenstoffe sowie $\omega_N = 0,154$ für Amidstickstoff) (136). Anhand der Gleichung 5 wurde auf diese Weise die chemische Gesamtverschiebung $\Delta\delta_{\text{gesamt}}$ berechnet.

Gleichung 5: Berechnung der chemischen Gesamtverschiebung.

$$\Delta\delta_{\text{gesamt}} = \sqrt{(\Delta\delta_{C/N} \cdot \omega_{C/N})^2 + (\Delta\delta_H)^2}$$

Dabei steht $\Delta\delta_{C/N}$ für die Verschiebung in der ¹³C- bzw. ¹⁵N-Dimension in ppm und $\Delta\delta_H$ für die Verschiebung in der ¹H-Dimension in ppm.

Fluoreszenzmikroskopie

Die Lokalisation von endogenem NmPin in *N. maritimus*-Zellen wurde von Dr. Franziska Trusch (University of Aberdeen) fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dazu wurden die Zellen aus einer 10 ml *N. maritimus*-Kultur bei 4800 xg und 25 °C für 60 min geerntet. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 200 µl SCM-Medium oder PBS (pH 7,4) resuspendiert und die Suspension für 1 h bei 29 °C auf poly-Lysin beschichteten Deckgläschen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 15 min bei Raumtemperatur mit eisgekühltem 4 % (m/v) Paraformaldehyd in PBS (pH 7,4) und 0,1 % (v/v) Triton zur Permeabilisierung fixiert. Darauf folgten fünf Waschschrte mit PBS für jeweils 3 min, um die Quervernetzungsreaktion zu beenden. Im Anschluss wurde für 1 h bei Raumtemperatur mit 5 % (m/v) Ziegenserum in PBST geblockt, gefolgt von einer Inkubation mit anti-NmPin-Antikörper (1:50) in 3 % (m/v) Ziegenserum/PBST bei 4 °C über Nacht. Die Zellen wurden viermal für jeweils 3 min mit PBST gewaschen und anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Alexa488-gekoppelten Sekundärantikörper anti-Kaninchen aus der Ziege (2 µg/ml) in 3 % (m/v) Ziegenserum/PBST für 1 h bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden abschließend viermal für je 3 min mit PBST gewaschen. Die DNA wurde mit 4',6-Diamidin-2-

phenylindol (DAPI) gefärbt, welches dem Fixier-Medium beim Aufbringen der Zellen bereits zugesetzt war. Alle Aufnahmen wurden mit einem Zeiss Imager M2, ausgerüstet mit einer Halogen-Metall dampflampe und entsprechenden Filtersets (Alexa488: 495 nm/517 nm, Beleuchtungsdauer: 500 msec; DAPI: 395 nm/461 nm, Beleuchtungsdauer: 200 nsec), aufgenommen. Die Auswertung der Daten wurde mit Hilfe der ZEN 2012 SP *blue edition* Software (Zeiss) durchgeführt.

Transmissionselektronenmikroskopie

Hochauflösende Zellaufnahmen von *N. maritimus* sowie weitere Studien zur Lokalisation von *NmPin* in der Zelle wurden mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) von Dr. Franziska Trusch (University of Aberdeen) erstellt. Die Probenvorbereitung wurde in abgewandelter Form zu (137) durchgeführt. Eine 10 ml *N. maritimus*-Kultur wurde durch Zentrifugation bei 4800 xg und 25 °C für 60 min geerntet, der Überstand verworfen und das Pellet in 20 µl SCM-Medium oder PBS (pH 7,4) resuspendiert und für 30 min bei Raumtemperatur auf einem Kohlenstoffgitter mit ultradünnem Formvar (200 nm Maschen, Ladd Research Industries) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit SCM oder PBS für jeweils 5 min gewaschen, bevor sie mit 2 % (v/v) Glutaraldehyd/PBS für 5 min bei Raumtemperatur fixiert wurden. Es folgten drei weitere Waschschrte mit PBS für je 5 min und die Permeabilisierung der Zellmembran mit 2,5 % (v/v) Triton/PBS für 5 min bei Raumtemperatur. Im Anschluss an drei Waschschrte mit PBS (je 5 min) wurde mit 5 % (m/v) Ziegenserum/PBST für 30 min bei Raumtemperatur geblockt, welches mit drei weiteren Waschschrten mit PBSST150 (je 5 min) entfernt wurde. Darauf folgte die Inkubation mit anti-*NmPin*-Antikörper (1:20) in 2 % (m/v) Ziegenserum/PBST für 3 h bei Raumtemperatur und drei anschließenden Waschschrten mit PBST (je 5 min). Als Zweitantikörper wurde ein anti-Kaninchen Antikörper aus der Ziege, konjugiert mit 5 nm kolloidalen Goldpartikeln (1:20, Sigma), verwendet, welcher für 60 min bei Raumtemperatur in 2 % (m/v) Ziegenserum/PBST inkubiert wurde. Gefolgt von drei Waschschrten mit PBST für jeweils 5 min, wurde der *NmPin*-IgG-Komplex erneut mit 2 % (v/v) Glutaraldehyd/PBS für 5 min bei Raumtemperatur fixiert. Abschließend wurde dreimal mit PBST für jeweils 5 min und einmal mit *Aqua bidest.* für 15 min gewaschen und der Ansatz an der Luft über Nacht getrocknet. Die Aufnahmen wurden an einem JEOL 1400 plus (AMT UltraVUE camera) mit einer Spannung von 80 kV erstellt. Die Auswertung der Bilder erfolgte mit ImageJ.

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung von rekombinantem Protein in *E. coli*

Zur biochemischen und biophysikalischen Untersuchung des *single domain*-Parvulins (sdPar) *NmPin* aus *N. maritimus*, wie auch zur Herstellung eines anti-*NmPin*-Antikörpers für immunologische Studien wurden große Mengen an reinem Protein benötigt, welches daher heterolog in *E. coli* überexprimiert wurde. Die Herstellung von *NmPin* Wildtyp Protein sowie verschiedener Mutanten für funktionelle Studien erfolgte in gleicher Weise und wird hier am Beispiel von *NmPin* Wildtyp dargestellt. *NmPin* wurde als Fusionsprotein mit GST-tag in *E. coli* exprimiert und mittels GST-Affinitätschromatographie gereinigt (Abbildung 3-1A). Der GST-tag wurde proteolytisch entfernt und die einzelnen Proteine mithilfe einer Größenausschlußchromatographie voneinander getrennt (Abbildung 3-1B). Die einzelnen Schritte der Reinigung konnten mit Hilfe einer SDS-PAGE nachverfolgt werden (Abbildung 3-1C) und die hohe Reinheit der Probe bestätigte sich bei der MALDI-TOF Massenspektrometrie von *NmPin* (Abbildung 3-1D).

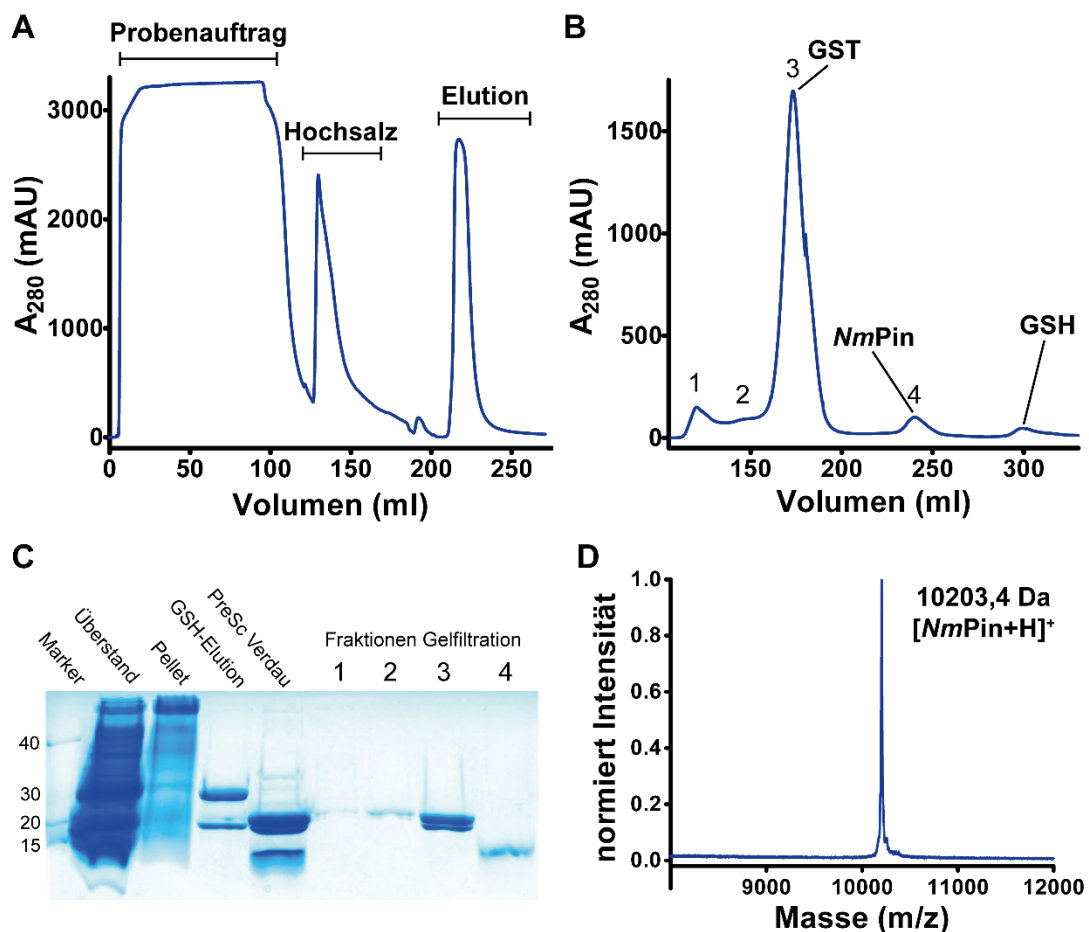


Abbildung 3-1: Herstellung von rekombinantem *NmPin*. (Legende auf der folgenden Seite)

Abbildung 3-2: (Abbildung auf der vorherigen Seite)

(A) Chromatogramm einer GST-Affinitätschromatographie von dem Fusionsprotein *NmPin*-GST. Die Elutionsfraktion wurde aufgefangen und mit der Protease PreScission inkubiert. (B) Chromatogramm einer Gelfiltration des Proteingemischs nach PreScission-Verdau des isolierten Fusionsproteins *NmPin*-GST. (C) SDS-PAGE-Analyse der einzelnen Schritte der Expression und Proteinreinigung von rekombinantem Protein. Die Fraktion 4 der Gelfiltration enthält das isolierte *NmPin*. (D) MALDI-TOF-Spektrum von *NmPin*.

3.2 *NmPin* wird endogen in *N. maritimus* exprimiert

Der mesophile Thaumarchaeote *N. maritimus* (freundliche Gabe von Dr. Martin Könneke, MARUM, Universität Bremen) wurde in synthetischem Meerwasser kultiviert und das Wachstum indirekt über die Produktion von Nitrit verfolgt. Das Wachstum ließ sich in drei Phasen unterteilen, die frühe *lag*-Phase mit einem geringen Populationswachstum, die *log*-Phase mit einem exponentiellen Zellzuwachs und einer stationären Phase, in der kein weiteres Wachstum stattfand (Abbildung 3-3A). In der *log*-Phase mit dem höchsten Populationswachstum betrug die Verdopplungszeit vier Tage. Die Ernte der Zellen erfolgte mittels Zentrifugation, so dass aus einer 5 l Kultur ein etwa Centstück-großes Pellet gewonnen werden konnte. Nach Abdampfen des Wassers im Rotationsverdampfer und Subtraktion der Salzmenge konnte eine Zelltrockenmasse von 0,4 mg/l ermittelt werden. In dem Genom von *N. maritimus* (110) konnte ein Gen in einem offenen Leseraster identifiziert werden, welches der Sequenzhomologie zufolge für eine PPlase des Parvulintypus kodiert. Das entsprechende Protein wurde in Anlehnung an das crenarchaeale Parvulin PinA aus *Cenarchaeum symbiosum* *NmPin* genannt (118).

Um die endogene Expression der PPlase *NmPin* zu untersuchen, wurden Western *blot* und ELISA-Experimente mit einem Antikörper gegen rekombinantes *NmPin*-Protein durchgeführt. Die erfolgreiche Ernte und der Aufschluss der Zellen konnte zuvor mit Hilfe einer SDS-PAGE gezeigt werden, in der sich eine typische Proteinleiter abbildet (Abbildung 3-3B). Für die weiteren Analysen wurde das Zelllysate mittels Ultrazentrifugation in eine lösliche und eine unlösliche Fraktion getrennt. In dem Western *blot* zeigten sich deutliche Banden auf einer Höhe von 10 kDa, welche die endogene Expression von *NmPin* als Eindomänenprotein, als so genanntes *single domain* Parvulin (*sdPar*), bestätigten (Abbildung 3-3C). Endogenes *NmPin* konnte sowohl in der löslichen, als auch in der unlöslichen Zellfraktion nachgewiesen werden, während heterolog in *E. coli* exprimiertes *NmPin* nahezu vollständig in der löslichen Fraktion vorlag (Abbildung 3-1C). Eine Quantifizierung der Banden über die Intensität

(ImageJ) ergab ein Verhältnis von löslichem *NmPin* zu der unlöslichen Population von 2:1 (Abbildung 3-3D).

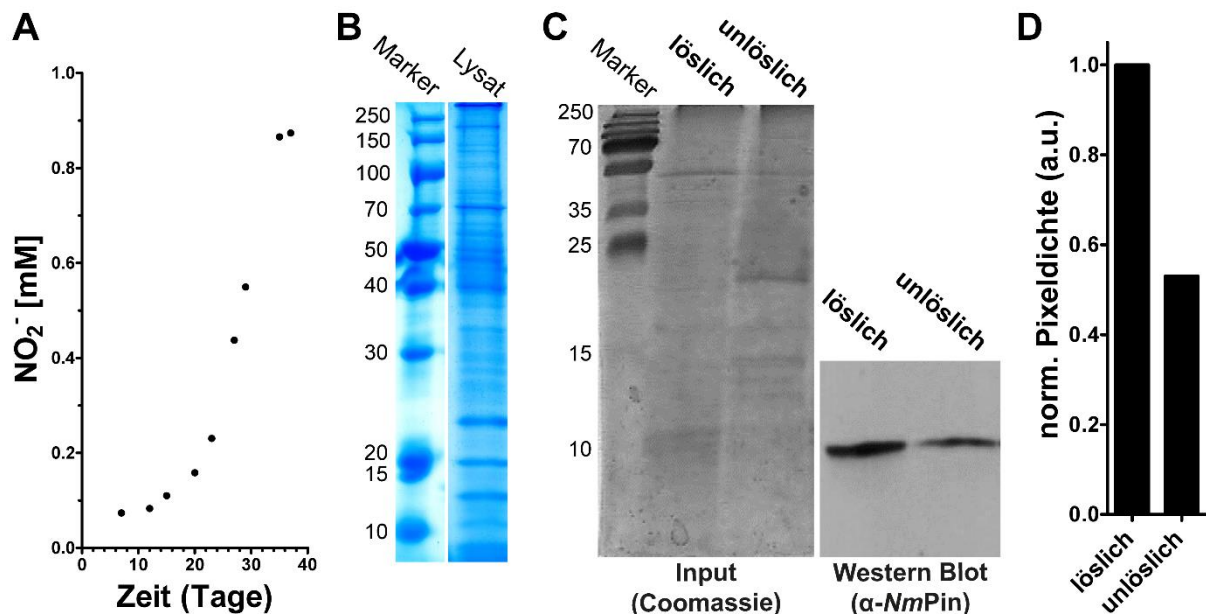


Abbildung 3-3: Endogene Expression von *NmPin* in *N. maritimus*. (A) Wachstumskurve von *N. maritimus* in synthetischem Meerwasser. Die Quantifizierung erfolgte über den Gehalt an Nitrit, welches bei der metabolischen Oxidation von Ammonium gebildet wird. (B) SDS-PAGE-Analyse von *N. maritimus*-Zellysat. (C) SDS-PAGE-Analyse und Western blot-Analyse von fraktionierten *N. maritimus*-Zellysaten. (D) Quantifizierung der Proteinmenge der Western blot-Analyse über die Intensität mit Hilfe von ImageJ.

Zur Quantifizierung von endogenem *NmPin* in *N. maritimus*-Zellysaten wurden ELISA Studien durchgeführt. Dabei konnte eine Gesamtmenge von 840 ng *NmPin* pro 1 mg Zelltrockenmasse ermittelt werden.

3.3 *NmPin* ist eine aktive, substratselektive Isomerase

Auf der Grundlage einer Sequenzhomologie wurde *NmPin* den Parvulinen zugeordnet (118), einer Familie der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPlasen). Die enzymatische Aktivität des rekombinanten Proteins wurde in einem indirekten PPlase-Assay untersucht. Das verwendete Substratpeptid Succinyl-Ala-Arg-Pro-Phe-*para*Nitroanilin (Suc-Ala-Arg-Pro-Phe-pNA) wird dabei *trans*-Isomer-spezifisch von der Protease α -Chymotrypsin geschnitten. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt dieser Kinetik ist jedoch die *cis*- zu *trans*-Isomerisierung, welche von einer PPlase katalysiert werden kann. Bei Abwesenheit einer PPlase fand eine langsame, thermische Isomerisierung statt. Mit steigender Konzentration an *NmPin* wurde die Reaktion beschleunigt (Abbildung 3-4A). Die Kurvenverläufe der Messungen wurden

mit Hilfe von biexponentiellen Ausgleichskurven quantifiziert und für jede Enzymkonzentration die Geschwindigkeitskonstante k_{cat} ermittelt. Für die im Assay verwendeten PPlase-Konzentrationen ergab sich eine lineare Abhängigkeit zur Reaktionsgeschwindigkeit (Abbildung 3-4B), so dass die katalytische Effizienz k_{cat}/K_M von *NmPin* für das Arg-Pro-Substrat mit $609 \pm 317 \text{ mM}^{-1}\text{sec}^{-1}$ ermittelt wurde. Anders als die dem Prolin nachfolgende Aminosäure, spielt der Aminosäurerest N-terminal zum Prolin eine entscheidende Rolle bei der Sequenzspezifität von PPlasen (138, 139). Um die Spezifität bzw. Selektivität von *NmPin* für verschiedene Reste proximal zum Prolin zu untersuchen, wurden weitere Peptide mit dem Gerüst Suc-Ala-Xaa-Pro-Phe-pNA als Substrate getestet (Abbildung 3-4C). *NmPin* zeigte keine katalytische Aktivität für das Substrat mit einem phosphorylierten Serin (pSer) N-terminal zum Prolin. Die Isomerisierung von allen anderen getesteten Substraten mit nicht phosphorylierten Resten wurde hingegen katalysiert. Dabei zeigten sich die höchsten Aktivitäten für das Arg-Pro- sowie für das Leu-Pro-Motiv. Nur schwach aktiv war *NmPin* für die Peptide, die Phe-Pro oder Ser-Pro enthielten.

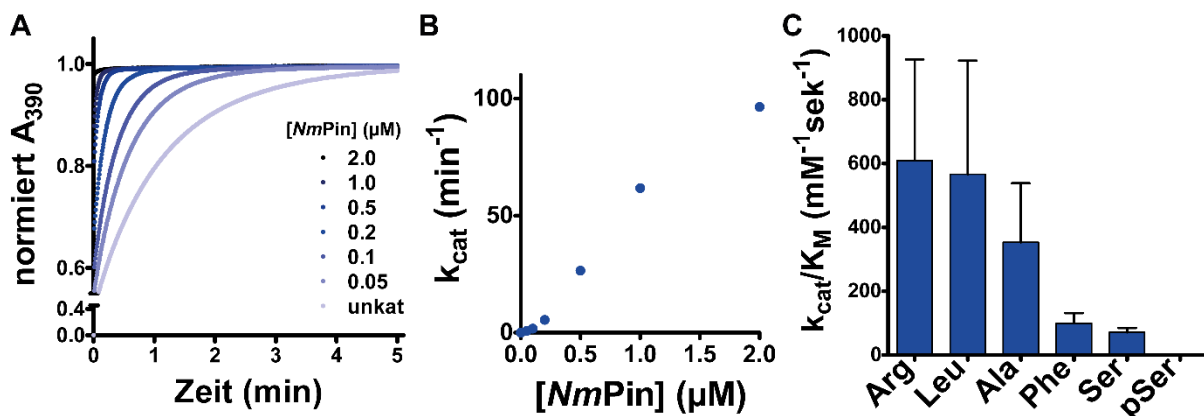


Abbildung 3-4: Isomeraseaktivität von *NmPin*. (A) Absorptionskurven der zeitaufgelösten Spaltung des Peptids Suc-Ala-Arg-Pro-Phe-pNA in Abwesenheit einer Isomerase und in Anwesenheit von aufsteigenden Konzentrationen *NmPins* in einem Protease-gekoppelten Isomerase-Assay. Ein steilerer Kurvenverlauf entspricht einer schnelleren Isomerisierung von *cis* zu *trans*. Der Farbgradient zeigt die Konzentration an *NmPin* von 0 μM (hellblau) bis hin zu 2,0 μM (dunkelblau). (B) Auftragung der katalytischen Geschwindigkeitskonstanten k_{cat} , welche aus den Messkurven in A generiert wurden, gegen die *NmPin* Konzentration. (C) Balkendarstellung der katalytischen Effizienz k_{cat}/K_M von *NmPin* für verschiedene Substratpeptide mit dem Grundgerüst Suc-Ala-Xaa-Pro-Phe-pNA.

3.4 NMR-Struktur von *NmPin*

Die dreidimensionale Struktur von *NmPin* (PDB ID: 2M08) wurde von Dr. Christoph Lederer mithilfe der NMR-Spektroskopie gelöst. Die Grundlage für Interaktionsstudien und funktionelle Untersuchungen in dieser Arbeit war die Zuordnung einzelner Gruppen zu einer jeweiligen Resonanz (Abbildung 3-5A).

NmPin nimmt eine für Parvuline typische Faltung aus vier Faltblättern ein, welche von vier Helices „umhüllt“ werden (58, 27). Zwischen den Sekundärstrukturelementen sind kurze *loops* und *turns* ausgebildet, wodurch *NmPin* eine kompakte, globuläre Faltung erhält (Abbildung 3-5B).

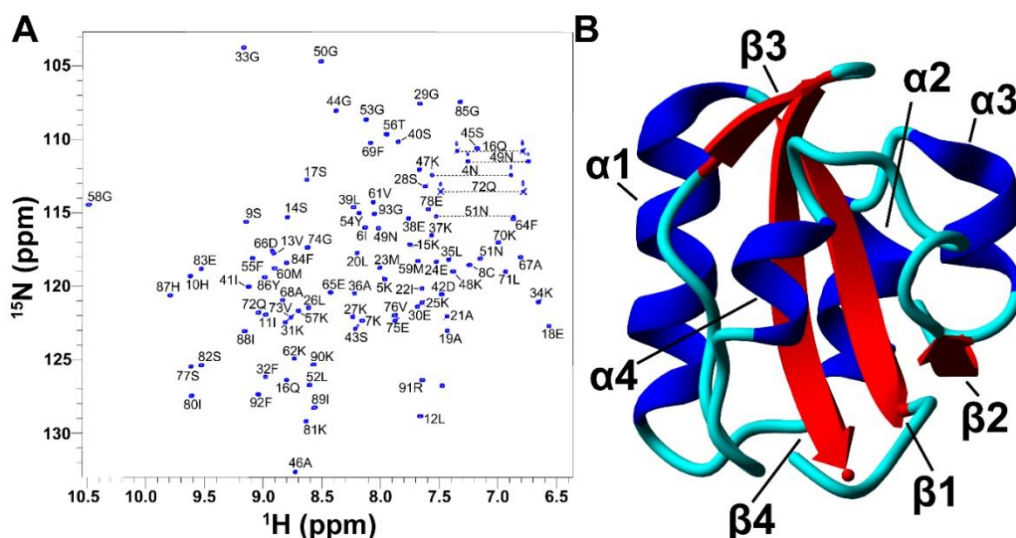


Abbildung 3-5: NMR-Struktur von NmPin. (A) ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum von NmPin mit Zuordnung der N_H -Resonanzen zu dem jeweiligen Aminosäurerest. (B) Modell der dreidimensionalen Struktur von NmPin (PDB ID: 2M08). Annotiert ist die Reihenfolge der Sekundärstrukturelemente α -Helix (blau), β -Faltblatt (rot) und *loop*- bzw. *turn*-Bereiche (cyan).

NmPin weist im Vergleich zu anderen Parvulin-Proteinen die größte strukturelle Ähnlichkeit zu *CsPinA* mit einer RMSD von 1,28 Å auf (Tabelle 3-1).

Tabelle 3-1: Sequenz- und Strukturvergleich verschiedener Parvulindomänen mit *NmPin*.

Protein	PDB ID	RMSD (C α) [Å]	Aminosäuren (n)	Sequenzidentität [%]	Quelle
CsPinA	2RQS	1.281	88	78.4	(52)
hPin1_PPlase	1NMW	1.301	89	44.9	(57)
SaPrsA_PPlase	2JZV	1.302	84	54.8	(60)
TbPin1_PPlase	2LJ4	1.382	89	38.2	(61)
hPar14_PPlase	3UI4	1.715	86	46.5	(85)
EcPpiD_PPlase	2KGJ	1.732	80	30.0	(55)
AtPin1	1J6Y	1.905	86	39.5	(49)
EcPar10	1JNT	2.267	84	41.7	(54)

Aus dem Strukturvergleich mit dem humanen, strukturell hoch aufgelösten Par14 ließ sich die Position des aktiven Zentrums ableiten, welche durch die katalytische Tetrade Cys/Asp-His-His-Thr/Ser gebildet wird (85). In *NmPin* wird das aktive Zentrum vermutlich durch das Parvulin-typische duale Histidinmotiv (140), bestehend aus His10 und His87, gebildet. Flankiert werden die beiden Histidine von Asp42 und Ser82. In Bezug auf Faltung und räumliche Ausmaße besitzt das aktive Zentrum eine große Homologie zu dem von Par14, welches von den Resten Asp74-His42-His123-Thr118 gebildet wird (85).

Ein auffälliges Merkmal von *NmPin* zeigte sich nach Berechnung des elektrostatischen Potenzials der Proteinoberfläche. Eine Ansammlung von acht Lysinen (Lys5, Lys7, Lys31, Lys34, Lys37, Lys47, Lys48, Lys90) erzeugt eine stark positiv geladene Fläche auf der dem aktiven Zentrum gegenüber liegenden Seite. Der Bereich oberhalb des katalytischen Zentrums wird hingegen von negativ geladenen Resten (Asp42, Glu83) gebildet (Abbildung 3-6).

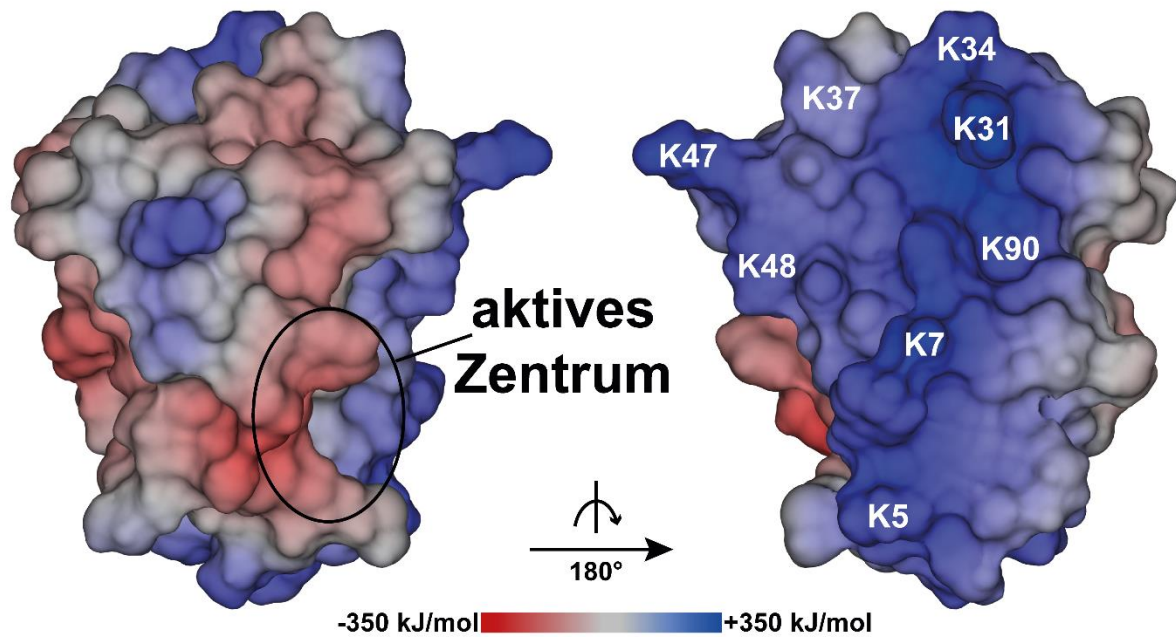


Abbildung 3-6: Elektrostatistisches Oberflächenpotential von *NmPin*. Dargestellt ist das Strukturmodell von *NmPin* mit dem, nach der *Particle Mesh Ewald* Methodik berechnetem, elektrostatistischem Potenzial der Moleküloberfläche. Das Ladungsvorzeichen und die Energiedichte sind durch einen Farbgradienten gekennzeichnet, wobei dunkelrot einer maximal negativen Ladung (-350 kJ/mol), grau neutral (0 kJ/mol) und dunkelblau einer maximal positiven Ladung (+350 kJ/mol) entspricht. Annotiert sind zudem der Bereich des katalytisch aktiven Zentrums sowie alle Lysinreste innerhalb der gleichmäßig positiv geladenen Moleküloberfläche.

3.5 Substratbindungstasche und katalytisches Zentrum von *NmPin*

Aus der Strukturhomologie zu Par14 konnte die Position des aktiven Zentrums für *NmPin* abgeleitet werden (Abbildung 3-7A). Um die Funktionalität der vorhergesagten katalytischen Tetrade zu untersuchen, wurden die aussen stehenden Reste Asp42 und Ser82 einzeln zu Alaninen mutiert. Die resultierenden Mutanten D42A und S82A zeigten im Vergleich zum Wildtyp deutlich verringerte Katalyseraten mit Restaktivitäten von 1 % (D42A) und 3,5 % (S82A) (Abbildung 3-7B). Um auszuschließen, dass die verringerte enzymatische Aktivität der Mutanten auf einen Verlust der nativen Faltung zurück zu führen ist, wurde die Struktur der Proteine mithilfe der CD-Spektroskopie untersucht. Im Vergleich zum Wildtyp zeigten die CD-Spektren der beiden Mutanten bei 20 °C keine Unterschiede im Kurvenverlauf (Abbildung 3-7C). In Bezug auf die thermische Stabilität wurde jedoch eine Verringerung der Schmelztemperatur um 11,4 °C zwischen dem Wildtyp mit 51,4 °C und 40,0 °C für D42A bzw. S82A gemessen (Abbildung 3-7D). Veränderungen der Proteinstruktur zeigten sich erst ab 25 °C, so dass eine Beeinträchtigung der Proteinstabilität unter den Messbedingungen der Isomerasetätigkeit bei 10 °C ausgeschlossen werden konnte.

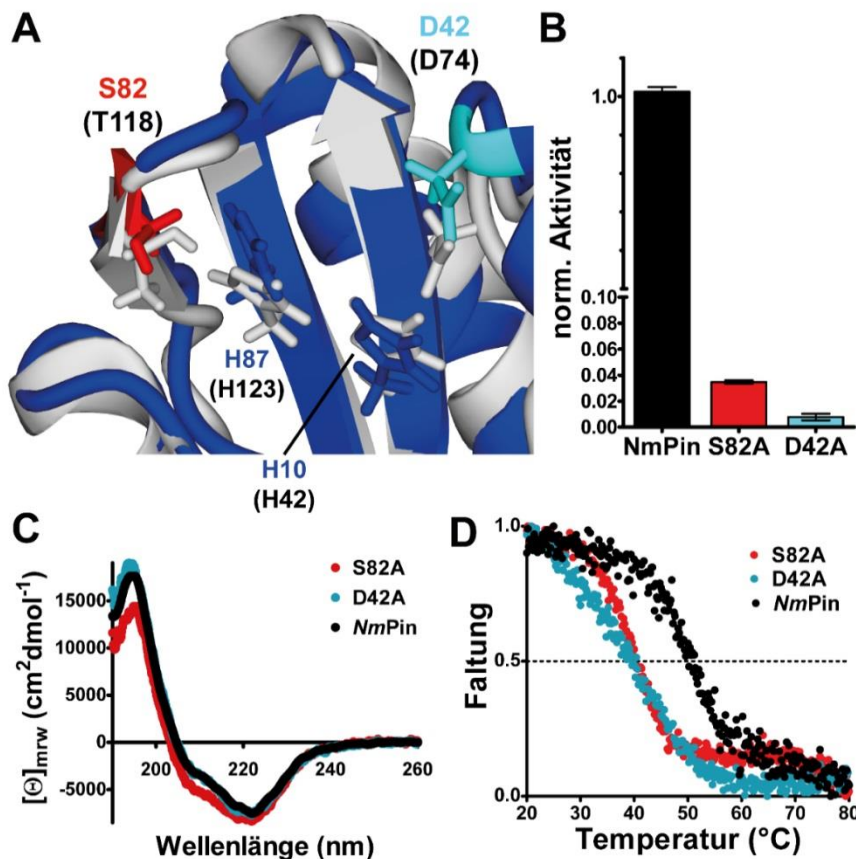


Abbildung 3-7: Katalytisches Zentrum von NmPin. (A) Strukturüberlagerung von NmPin (blau, PDB ID: 2M08) und hPar14 (grau, PDB ID: 3UI4). Beschriftet sind Aminosäurereste der katalytischen Tetrade (C/D-H-H-S/T, (85) mit S82 (rot), D42 (cyan) und H10/H87 (blau) in NmPin und den homologen Resten in hPar14 (schwarz in Klammern). (B) Balkendiagramm der normierten Isomeraseaktivität von NmPin (schwarz) und den Mutanten S82A (rot) und D42A (cyan) für das Substrat Suc-Ala-Arg-Pro-Phe-pNA aus einem Protease-gekoppelten Isomerase-Assay. (C) CD-Spektren von NmPin (schwarz) und den Mutanten S82A (rot) und D42A (cyan). (D) CD-Entfaltungskurven von NmPin (schwarz), S82A (rot) und D42A (cyan), aufgenommen bei 222 nm.

Die genaue Position der Substratbindungstasche wurde mit einer *chemical shift perturbation*-Analyse ermittelt. Hierzu wurde das Substrat Suc-Ala-Arg-Pro-Phe-pNA schrittweise zu $[^{15}\text{N}]\text{NmPin}$ titriert und nach jedem Titrationsschritt ein ^1H - ^{15}N -SOFAS-HMQC aufgenommen. Amidgruppen von Aminosäuren, deren H_N -Resonanzen bei der Titration Veränderungen der chemischen Verschiebung zeigten, nahmen an der Bindung des Liganden teil. Alle H_N -Resonanzen, bei denen sich eine Änderung der chemischen Verschiebung von $\geq 0,04$ ppm zeigte, gehörten ausnahmslos zu Aminosäureresten des aktiven Zentrums oder zu denen der unmittelbaren Peripherie (D42, K47, G53, M60, V61, A68, E83, Y86, I88) (Abbildung 3-8).

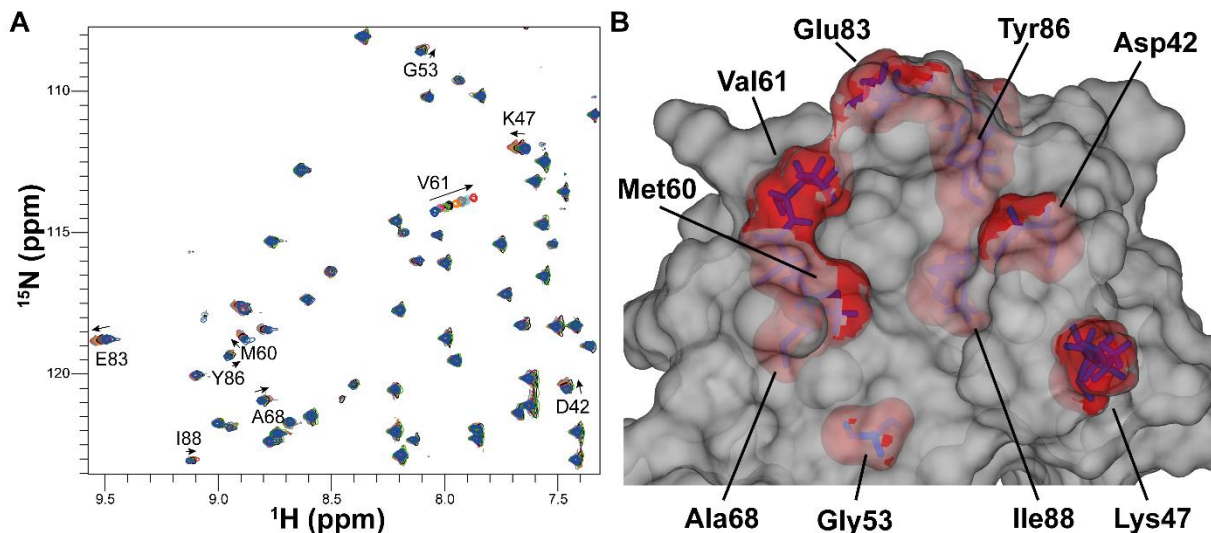


Abbildung 3-8: Substratbindung von *NmPin*. (A) ^1H - ^{15}N -SOFAST-HMQC NMR-Spektrum einer Titration des Substratpeptids Suc-Ala-Arg-Pro-Phe-pNA zu *NmPin*. Die verschiedenfarbigen Signale zeigen die chemische Verschiebung nach schrittweise Zugabe des Peptids zu *NmPin* von 0 mM (blaues Spektrum) bis zu 15 mM (rotes Spektrum). An der Bindung beteiligte Reste sind beschriftet und die Richtungen der Resonanzänderungen sind mit Pfeilen markiert. (B) Oberflächenmodell von *NmPin*. Markiert und als *stick*-Modell (violett) dargestellt sind Reste welche in der *chemical shift perturbation*-Analyse eine chemische Gesamtverschiebung $\geq 0,04$ ppm aufwiesen. Oberflächenexponierte Aminosäuren sind mit roter Oberfläche auf der Moleküloberfläche von *NmPin* (grau) gezeigt.

3.6 Oberflächenexponierte Reste beeinflussen Substratbindung und Aktivität

Die größte katalytische Aktivität mit $k_{\text{cat}}/K_M = 609 \pm 317 \text{ mM}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ zeigte *NmPin* für das Arg-Pro-Motiv, was eine Interaktion des basischen Arginin mit den sauren Resten nahe der Substratbindungstasche vermuten lässt. Um einen Ladungseinfluss bei der Bindung eines Liganden zu untersuchen, wurden chemische Sondierungsstudien durchgeführt. Hierzu wurde die Reaktionsgeschwindigkeit einer positiv geladenen Thiolverbindung (Cysteamin) sowie einer negativ geladenen Thiolverbindung (Thioglykolsäure) bei der Bindung an die Seitenkette des Cys8 in *NmPin* ermittelt. Dieses einzige Cystein in *NmPin* befindet sich in reduziertem Zustand im hydrophoben Kern des Proteins und ist über das aktive Zentrum zugänglich für Lösungsmittel und kleine Moleküle (Abbildung 3-9A). Im ersten Schritt konnte Cys8 mit 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) umgesetzt werden, um anschließend gegen Thioglykolsäure bzw. Cysteamin ausgetauscht zu werden (Abbildung 3-9B). Ein möglicher Kandidat für einen Ladungseinfluss bei der Ligandenbindung ist das oberflächenexponierte, negativ geladene Glu83, welches entsprechend der NMR-Titration an der Bindung des Peptids beteiligt ist (Abbildung 3-8B). Der Einfluss dieser Position auf die Bindungskinetik von geladenen Liganden sowie auf die Isomeraseaktivität wurde mit Hilfe der beiden Mutanten E83Q und E83R untersucht.

Die Substitutionsreaktionen erfolgten bei allen Proteinen (*NmPin*, E83Q, E83R) für beide Liganden nahezu vollständig, die Geschwindigkeit des Austauschs gegen die positiv geladene Thiolverbindung war jedoch bei den drei Ansätzen doppelt so hoch wie die Substitution mit der negativ geladenen Verbindung (Abbildung 3-9C). Der ausbleibende Effekt der Position 83 konnte darüber hinaus über die Isomeraseaktivität bestätigt werden, in der keine deutliche Differenz der Aktivität zwischen dem Wildtyp und den Mutanten gemessen werden konnte (Abbildung 3-9D).

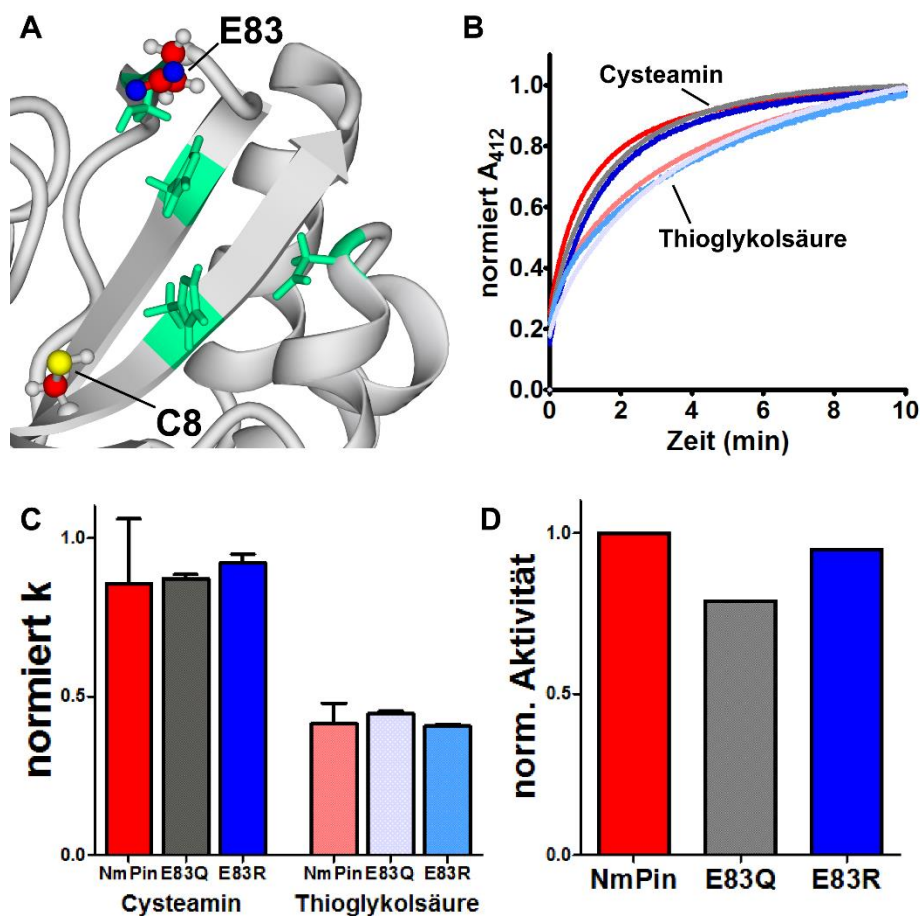


Abbildung 3-9: Chemisches Sondieren des katalytischen Zentrums von *NmPin*. (A) Strukturmodell des katalytischen Zentrums von *NmPin* mit der katalytischen Tetrade (hellgrün), dem exponierten Glu83 oberhalb der Substratbindetasche und dem chemisch adressierbaren Cys8. (B) Absorptionskurven der zeitaufgelösten Bindung von geladenen Thiolverbindungen (Cysteamin in dunklen Farben; Thioglykolsäure in hellen Farben) an das Cys8 im katalytischen Zentrum von *NmPin* (rote Kurven) und den Mutanten E83Q (graue Kurven), sowie E83R (blaue Kurven). (C) Balkendarstellung der Geschwindigkeitskonstanten der Reaktionen aus B für die Reaktion mit Cysteamin (dunkle Farben) und Thioglykolsäure (helle Farben) an *NmPin* (rot), E83Q (grau) und E83R (blau). (D) Balkendarstellung der Isomeraseaktivität von *NmPin* (rot), E83Q (grau) und E83R (blau) für das Substrat Suc-Ala-Arg-Pro-Phe-pNA aus einem Protease-gekoppelten Aktivitäts-Assay.

Im Rahmen der Titration des Substratpeptids Suc-Ala-Arg-Pro-Phe-*p*NA zu *NmPin* Wildtyp konnte die größte Änderung in der chemischen Verschiebung für die Amidprotonen von Val61 gemessen werden (Abbildung 3-8). Eine vergleichbare Änderung wurde auch bei einer Titration von *NmPin* mit dem Prolinanalogen *trans*-4,5-Dihydroxy-1,2-dithian (DTT_{ox}) beobachtet (Daten nicht gezeigt), welches zuvor erfolgreich als Ligand zur Kristallisation von Par14 verwendet wurde und dort im aktiven Zentrum gebunden hat (85)(PDB ID: 3UI6). Auch bei der Bindung des Substratpeptids kann daher von einer Interaktion zwischen Val61 und dem Prolinrest ausgegangen werden kann. Um den Einfluss des oberflächenexponierten Val61 (Abbildung 3-10A) auf die Ligandenbindung und die katalytische Aktivität von *NmPin* zu untersuchen, wurden im Rahmen der Masterarbeit von Basri Adiprasito die Mutanten V61A, V61D und V61T untersucht. Bei der Messung der Isomeraseaktivität zeigte sich, dass V61A mit einer verkürzten Seitenkette sowie V61D mit einer polaren und geladenen Seitenkette einen drastischen Verlust der katalytischen Aktivität zur Folge hatte. Lediglich die Mutante V61T, bei der gegenüber dem Wildtyp nur eine Methylseitenkette gegen eine Hydroxygruppe substituiert wurde, zeigte noch eine durchschnittliche Restaktivität von 30 % (Abbildung 3-10B). Trotz vollständigem Aktivitätsverlust der V61A-Mutante zeigte sich bei Zugabe von DTT_{ox} eine stärkere H_N-Resonanzveränderung der substituierten Aminosäure (Abbildung 3-10C) als für die gering aktive Threoninmutante (Abbildung 3-10D). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass es bei V61A zu einer Ligandenbindung kommt, die katalytische Umsetzung hingegen ausbleibt.

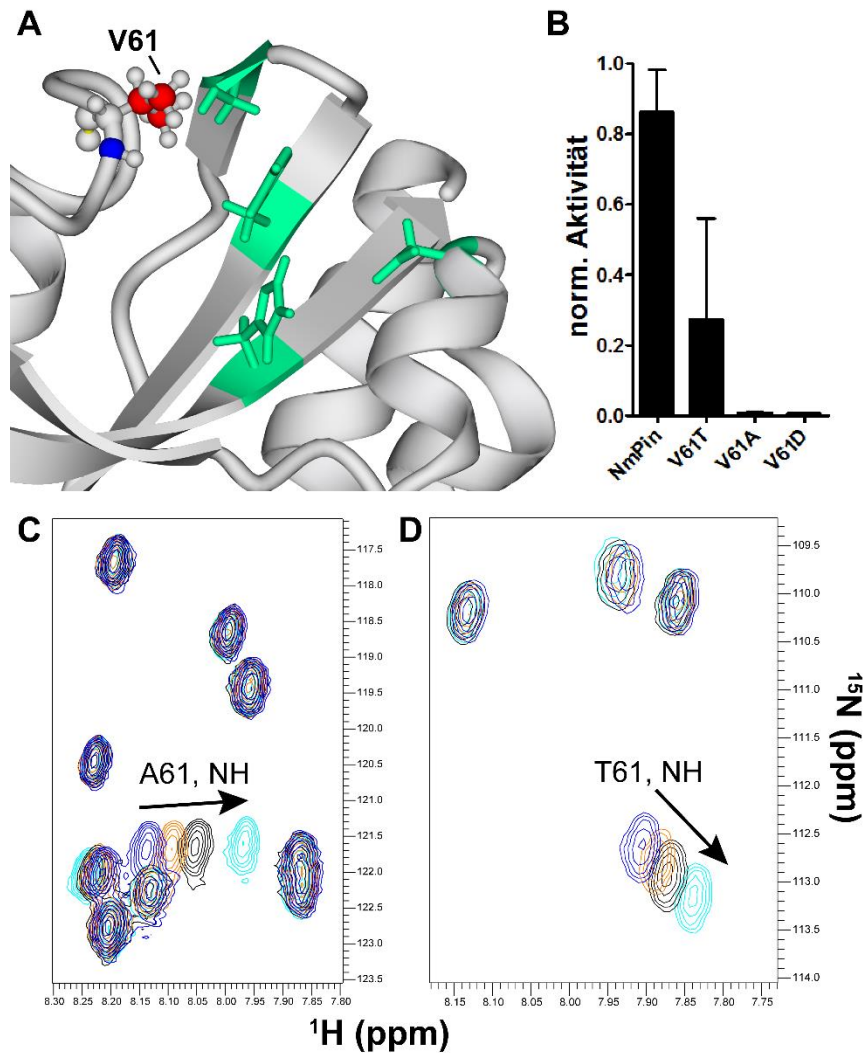


Abbildung 3-10: Einfluss von Val61 auf Substratbindung und Isomeraseaktivität von NmPin. (A) Strukturmodell des katalytischen Zentrums von NmPin mit den Resten der katalytischen Tetrade (hellgrün). Dargestellt ist der Aminosäurerest Val61 des loops zwischen $\beta 2$ und $\alpha 4$ mit Methylkohlenstoffatomen (rot) und dem Amidstickstoff in blau. (B) Balkendarstellung der Isomeraseaktivität von NmPin und den Mutanten V61T, V61A und V61D für das Substrat Suc-Ala-Arg-Pro-Phe-pNA. (C) NMR-Spektren einer ^1H - ^{15}N -SOFAST-HMQC-Titration von DTT_{ox} zu V61A. (D) NMR-Spektren einer ^1H - ^{15}N -SOFAST-HMQC-Titration von DTT_{ox} zu V61T. Die verschiedenfarbigen Spektren in C und D repräsentieren die schrittweise Zugabe von DTT_{ox} zum Protein: 0 mM DTT_{ox} (blau), 5 mM (orange), 10 mM (schwarz) und 30 mM (cyan). Die Pfeile zeigen die Richtung der NH -Resonanzverschiebung.

Um den genauen Einfluss von Val61 auf die Substratbindung zu untersuchen, wurden zudem Titrations durchgeführt bei denen nach jeder Substratzugabe ein ^1H - ^{13}C -HSQC aufgenommen wurde. Damit sollten die chemischen Verschiebungen der einzelnen Methylgruppen von Val61 bei der Ligandenbindung bestimmt werden. Um zwischen den beiden prochiralen γ -Methylgruppen des Val61, γproR und γproS differenzieren zu können, wurden zunächst Spektren mit einer 10 % ^{13}C -Isotopenmarkierten Proteinprobe aufgenommen. Bedingt durch den Aminosäuremetabolismus

des Expressionssystems *E. coli* ist es 10-fach wahrscheinlicher, dass der γ proR-Kohlenstoff und der β -Kohlenstoff beide aus ^{13}C -Kernen bestehen, da sie aus derselben Glukose-Einheit stammen, als es für γ proS und β -Kohlenstoff der Fall ist, die aus zwei verschiedenen Glukose-Molekülen stammen. Aus dieser unterschiedlichen Nachbarschaft ergibt sich ein unterschiedliches Kopplungsverhalten der betrachteten ^{13}C -Kerne in NMR-Studien. In einem nicht entkoppelten ^1H - ^{13}C -HSQC (141) von [10 % ^{13}C]NmPin konnten die beiden γ -Methylgruppen eindeutig unterschieden werden, da beide Gruppen in der ^1H -Achse aufspalten, aber nur die γ proR-Gruppe zusätzlich in der ^{13}C -Achse aufspaltet (Abbildung 3-11A). Die genauen chemischen Verschiebungen für die Methylgruppen konnten mit einem phasensensitiven *constant time* ^1H - ^{13}C -HSQC ermittelt werden, in dem ^{13}C -Kerne ohne Nachbarschaft zu einem weiteren ^{13}C -Kern (hier CyproS) eine Umkehrung der Phase erhalten (142) (Abbildung 3-11B).

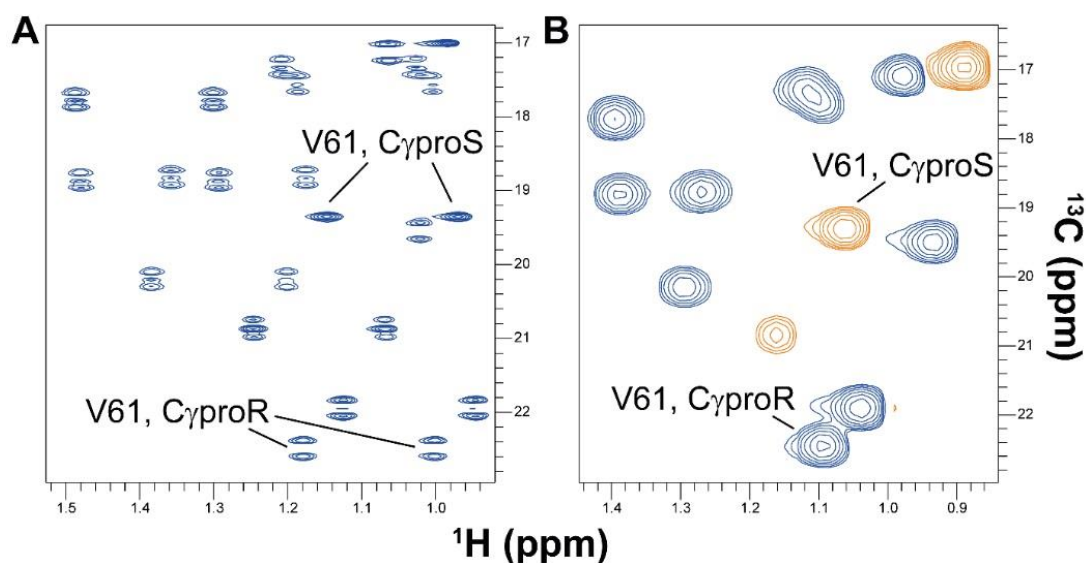


Abbildung 3-11: Prochirale Methylgruppen des Val61 in NmPin. (A) NMR-Spektrum eines nicht entkoppelten ^1H - ^{13}C -HSQCs von [10 % ^{13}C]NmPin. Annotiert ist die in ^1H -Achse aufspaltende CyproS-Methylgruppe sowie die in ^1H - und ^{13}C -Achse aufspaltende CyproR-Methylgruppe. (B) NMR-Spektrum eines phasensensitiven *constant time* ^1H - ^{13}C -HSQCs von [10 % ^{13}C]NmPin. Signale mit positivem Vorzeichen sind in blau, Signale mit negativem Vorzeichen in orange dargestellt.

Neben Val61 konnten in den Titrationsstudien weitere Aminosäurereste ermittelt werden, die an der Ligandenbindung beteiligt sind (Abbildung 3-12A). Die Reste Leu12 ($\text{C}\beta$, $\text{C}\gamma$, $\text{C}\delta 1$), Ile41 ($\text{C}\gamma 1$) und Leu52 ($\text{C}\delta 1$, $\text{C}\delta 2$) tragen wie das Val61 (CyproS, CyproR) hydrophobe, verzweigte Seitenketten und befinden sich gleichmäßig verteilt in direkter Nachbarschaft zur katalytischen Tetrade (Abbildung 3-12B). Nach Zugabe

von DTT_{ox} kam es bei dem Wildtyp bei allen vier Resten zu deutlichen Resonanzänderungen. Die γ -Methylgruppe des eingeführten Threonins bei der V61T-Mutante zeigte keine Beteiligung an der Bindung und die übrigen Veränderungen (Leu12, Ile41 und Leu52) erfolgten mit deutlich verringerter Intensität gegenüber der Wildtyp-Titration (Abbildung 3-12C). Für die inaktive T61A-Mutante konnten nur noch sehr schwache Änderungen bei Ile41 und Leu52 beobachtet werden, während Leu12 und die β -Methylgruppe des eingeführten Alanins keine Beteiligung an der Bindung hatten (Abbildung 3-12D). Die Ligandenbindung erfolgte demnach bei allen Proteinen unter Beteiligung der Amid-N_H-Gruppe der Aminosäure an Position 61. Nur bei dem katalytisch aktiven *NmPin*-Wildtyp kommt es zudem zu ausgeprägten Interaktionen mit den Seitenkettenmethylgruppen der vier verzweigten Resten Leu12, Ile41, Leu52 und Val61.

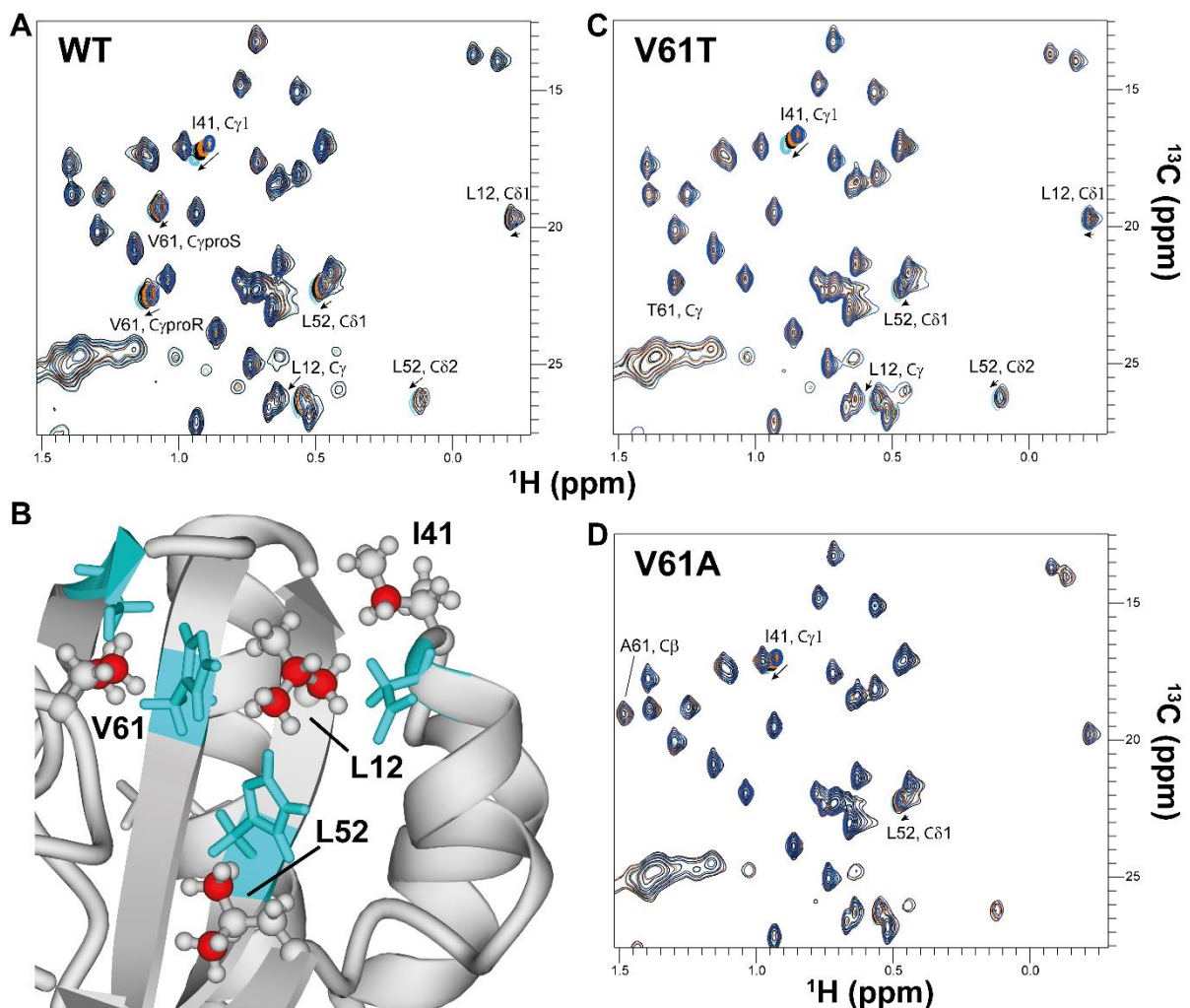


Abbildung 3-12: Substratfixierung durch ein Methylgruppennetzwerk im aktiven Zentrum von *NmPin*. (Legende auf der folgenden Seite)

Abbildung 3-13: (Abbildung auf der vorherigen Seite)

(A) NMR-Spektrum einer ^1H - ^{13}C -HSQC-Titration von DTT_{ox} zu *NmPin*. (B) Strukturmodell des katalytischen Zentrums von *NmPin*. Dargestellt ist die katalytische Tetrade (cyan), Reste deren Methylgruppen an der Bindung von DTT_{ox} beteiligt sind (rote Kugeln) sowie unbeteiligte Methylgruppen (graue Kugeln). (C) NMR-Spektrum einer ^1H - ^{13}C -HSQC-Titration von DTT_{ox} zu der Mutante V61T. (D) NMR-Spektrum einer ^1H - ^{13}C -HSQC-Titration von DTT_{ox} zu der Mutante V61A. Die verschiedenfarbigen Spektren in A, C und D zeigen die schrittweise Zugabe von DTT_{ox} zum Protein: 0 mM (blau), 5 mM (orange), 10 mM (schwarz) und 30 mM (cyan). An der Bindung beteiligte Methylgruppen sind annotiert und die Richtung der Resonanzveränderungen mit Pfeilen dargestellt.

3.7 *NmPin* bindet an Lipidvesikel *in vitro*

Durch die große Dimension und die gleichmäßige, positive Ladung bildet die Lysinreiche Fläche von *NmPin* eine ideale Stelle, um mit einem negativ geladenen Gegenspieler zu interagieren. Eine mögliche negativ geladene Fläche in der Zelle bietet die Membran. Die Zellmembran von *N. maritimus* ist als Einfachlipidschicht gebaut und besitzt überwiegend Crenarchaeol als Kernlipid (143). Crenarchaeol liegt als intaktes polares Lipid (IPL) vor, da es an der inneren sowie äusseren Membranoberfläche durch phosphatische-, glykosidische- oder phosphoglykosidische Kopfgruppen negativ geladen ist (143–146).

In einem Sedimentations-Assay mit Lipidextrakten aus Rinderhirn als IPL-Modell, überwiegend bestehend aus den negativ geladenen Lipiden Phosphatidylinositol und Phosphatidylserin, wurde *NmPin* auf Lipidbindungseigenschaften untersucht. In dem Fall, dass es zu einer Interaktion zwischen dem Protein und den Lipiden kommt, sedimentiert das Lipid-gebundene *NmPin*. Wird das Protein im Überschuss eingesetzt, verbleibt ein Teil ungebunden im Überstand.

Wie erwartet verringerte sich mit steigender Konzentration an bovinem Lipidextrakt (BLE) die Menge an löslichem *NmPin* im Überstand. Zugleich konnte eine Akkumulation des Proteins in der sedimentierten Lipidfraktion nachgewiesen werden (Abbildung 3-14A). Um die Lipidbindungseigenschaft auf die planare Lysinreiche Fläche (Abbildung 3-14B) zurückführen zu können, wurden die Lysine Lys7 und Lys34 zu Glutamaten mutiert. Bei der Berechnung der elektrostatischen Proteinoberfläche zeigte die Doppelmutante K7E/K34E eine deutliche Verringerung der positiven Ladung innerhalb der vermuteten Bindungsfläche (Abbildung 3-14C). Im Rahmen des Sedimentations-Assays konnte auch bei ansteigender Konzentration an BLE keine Sedimentation des Proteins durch Lipidbindung beobachtet werden (Abbildung 3-14A). Selbst eine Einfachmutante, bei der nur das innerhalb der Thaumarchaeota konservierte Lys7 (118) gegen ein Glutamat ausgetauscht wurde, besaß keine

Lipidbindungskapazität mehr (Abbildung 3-14A/C). Ein Verlust der Lipidbindungseigenschaft aufgrund von Strukturveränderungen konnte mittels CD-Spektroskopie ausgeschlossen werden (Abbildung 3-14D).

Um die elektrostatische Interaktion von rekombinantem *NmPin* mit BLE-Lipidvesikeln aus dem IPL-Modell auf das Bindungsverhalten von endogenem *NmPin* an der Membran übertragen zu können, wurde das Verhältnis von löslichem und unlöslichem Protein in den *N. maritimus*-Lysaten bei verschiedenen Salzkonzentrationen untersucht. Bei einer überwiegend Ladungs-abhängigen Interaktion ist zu erwarten, dass die Bindung durch Salz moduliert werden kann. Bei Konzentration von 0 und 125 mM NaCl konnte *NmPin* sowohl im Überstand, als auch in der unlöslichen Membranfraktion nachgewiesen werden, mit Verhältnissen von 1:0,6 (0 mM) und 1:0,43 (125 mM). Bei einer stark erhöhten Salzkonzentration (500 mM) lag hingegen nahezu das gesamte Protein in Lösung vor (Verhältnis 1:0,005) (Abbildung 3-14E).

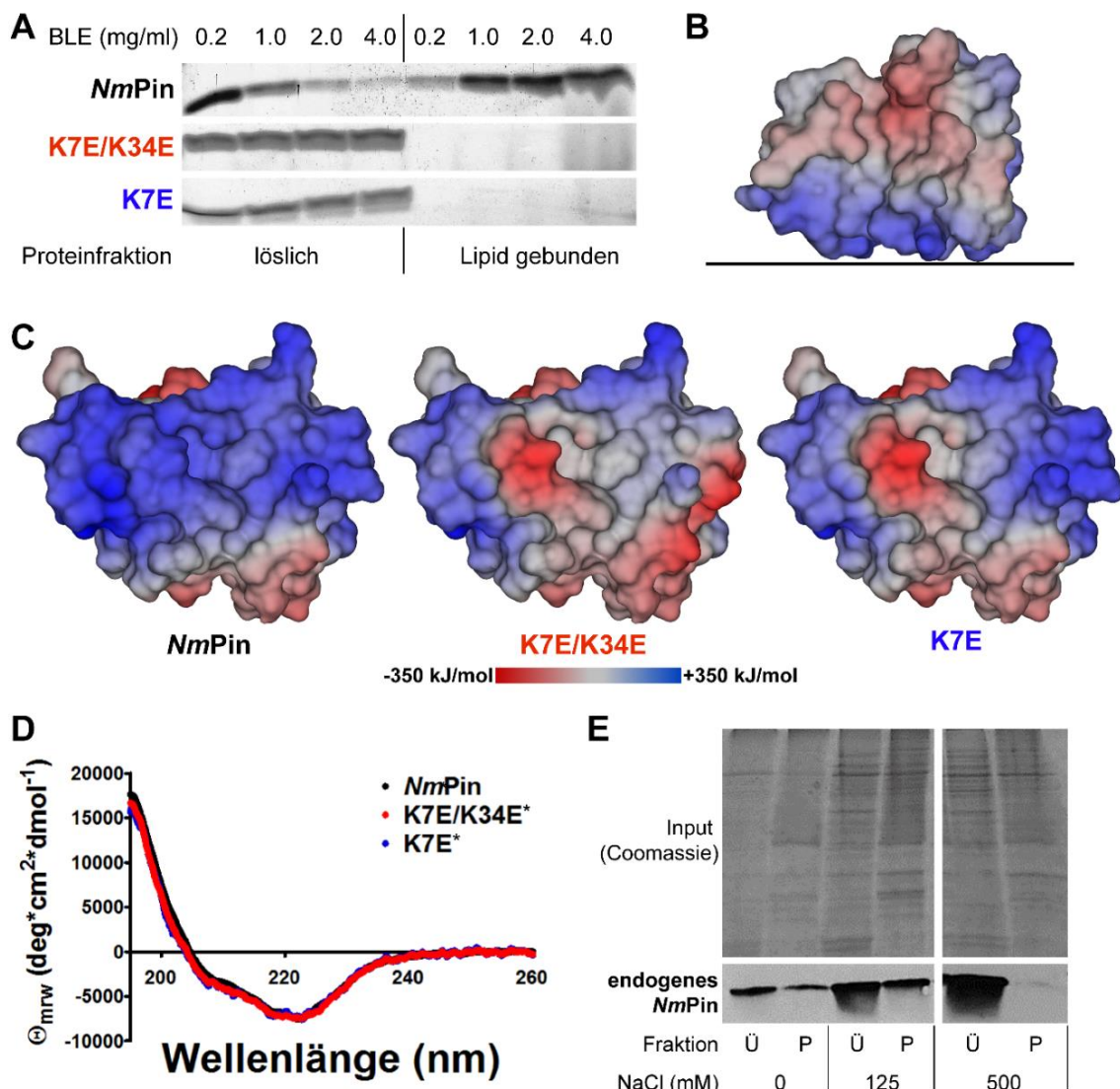


Abbildung 3-14: Lipidbindung von *NmPin*. (Legende auf der folgenden Seite)

Abbildung 3-15: (Abbildung auf der vorherigen Seite)

(A) SDS-PAGE-Analyse eines Lipidsedimentations-Assays. *NmPin* sowie die Mutanten K7E/K34E und K7E wurden mit aufsteigender Menge Rinderhirnextrakt (BLE) inkubiert, sedimentiert und die lösliche (linke Seite) sowie Lipid-gebundene (rechte Seite) Fraktion voneinander getrennt analysiert. (B) Strukturmodell von *NmPin* mit berechneter elektrostatischer Oberfläche. Der Balken repräsentiert eine Membranoberfläche. (C) Strukturmodelle von *NmPin* und den Mutanten K7E/K34E sowie K7E mit elektrostatischer Oberfläche des Lysin-reichen Bereichs. Der Farbgradient repräsentiert die Ladungsdichte von maximal negativer Ladung mit -350 kJ/mol (dunkelrot) über keine Ladung (grau, 0 kJ/mol) bis zu einer maximal positiven Ladung von +350 kJ/mol (dunkelblau). Die Substitution der Reste, sowie die Berechnung des Potentials erfolgte mit YASARA. (D) CD-Spektren von *NmPin* (schwarz), sowie der Mutanten K7E/K34E (rot) und K7E (blau). *Die beiden Mutantenspektren wurden zur besseren Vergleichbarkeit auf das *NmPin*-Spektrum normiert. (E) SDS-PAGE-Analyse (oben) und Western blot-Analyse (unten) von *N. maritimus*-Zelllysaten. Gezeigt ist das Verhältnis von endogenem *NmPin* in Überstand (Ü) zur Pelletfraktion (P) in Abhängigkeit der Salzkonzentration.

3.8 *In vivo* ist *NmPin* in der Zellhülle lokalisiert

Um die Lokalisation von endogenem *NmPin* in der Zelle näher zu charakterisieren, wurden von Dr. Franziska Trusch (Universität Aberdeen) fluoreszenzmikroskopische und transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Aufnahmen von *N. maritimus* gemacht. Die Zellen zeigten die charakteristische Stäbchenform (109), wenn sie bereits vor der Ernte durch Zugabe von Paraformaldehyd (PFA) fixiert wurden. Diese Beobachtung konnte sowohl in lichtmikroskopischen, wie auch in TEM-Aufnahmen gemacht werden (Abbildung 3-16A). Mit Hilfe eines Alexa488-gekoppelten anti-*rabbit*-Sekundärantikörpers und des anti-*NmPin*-Antikörpers aus *rabbit* konnte endogenes *NmPin* gleichmäßig verteilt in der Zellhülle detektiert werden, während die im Cytoplasma vorliegende DNA mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) angefärbt zentral in den Zellen lokalisiert war (Abbildung 3-16B). In den TEM-Bildern von *N. maritimus* war zudem eine auf die Membran aufgelagerte Schicht zu sehen, ein so genannter *surface layer* (S-Layer), welcher die Zelle vollständig umhüllt (Abbildung 3-16C).

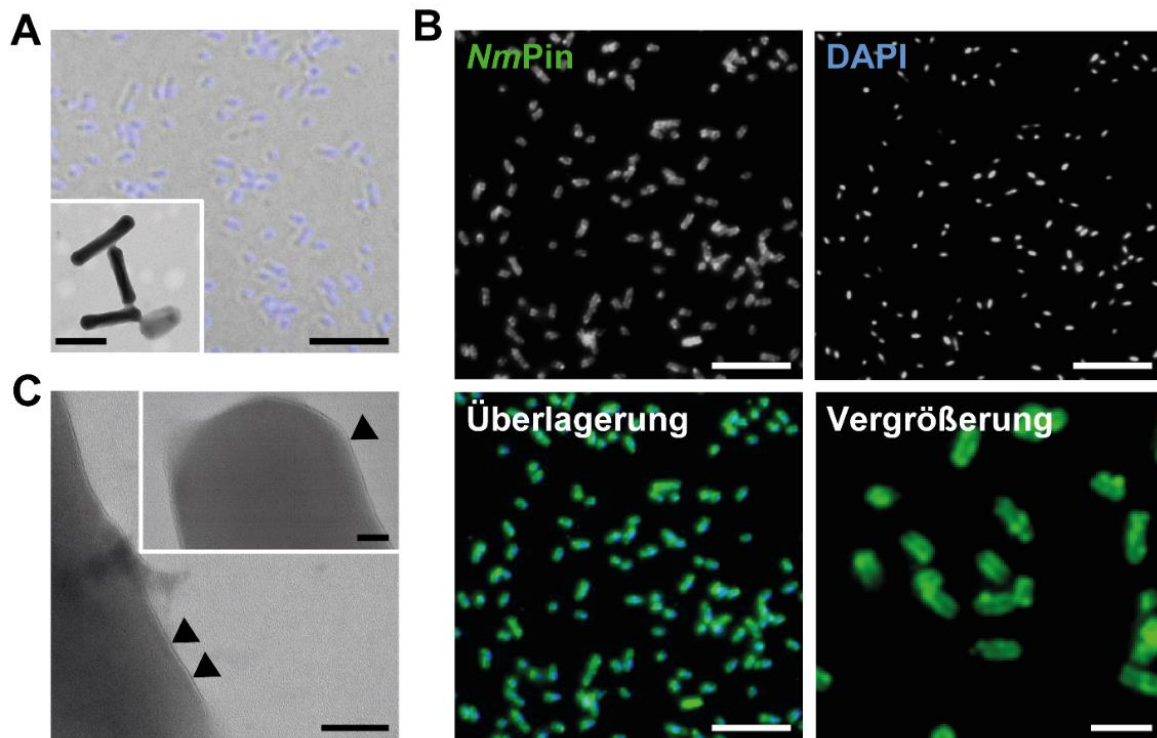


Abbildung 3-16: Mikroskopie von präfixierten *N. maritimus*-Zellen. (A) Lichtmikroskopische Aufnahme von *N. maritimus*-Zellen im Durchlicht mit DNA-DAPI-Färbung (Balken entspricht 5 μm). Das kleine Fenster zeigt eine TEM-Aufnahme der stäbchenförmigen Zellen (Balken: 500 nm). (B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *N. maritimus* mit immunologischer Färbung von NmPin mit Alexa488 (oben links) und Färbung der DNA mit DAPI (oben rechts). Überlagerung der Fluoreszenz von NmPin (grün) mit DAPI (blau) im Bild unten links. Die Balken repräsentieren 5 μm . Vergrößerung der NmPin-Alexa488 angefärbten Zellen unten rechts (Balken: 2 μm). (C) Hocho aufgelöste TEM-Aufnahmen von *N. maritimus*-Zellen zeigen einen aufgelagerten S-Layer (Pfeilspitzen). Der Balken entspricht 50 nm und 20 nm im kleinen Fenster.

Proben bei denen die Zellen vorab nicht im Medium fixiert wurden, zeigten einen deutlichen Verlust der Stäbchenform und eine Ausbildung runder Zellformen (Abbildung 3-17A). Bei diesen Zellen war in den TEM Aufnahmen kein, die Zelle vollständig umschließender, S-Layer zu erkennen (Abbildung 3-17A). Die DAPI-gefärbte DNA konnte weiterhin in klar definierten Bereichen beobachtet werden, zeigte jedoch im Vergleich zu den präfixierten Zellen eine weniger scharfe Abgrenzung. NmPin konnte ebenfalls in der Zellhülle detektiert werden. Die Verteilung um das Cytoplasma war deutlich weniger gleichmäßig als in präfixierten *N. maritimus* (Abbildung 3-17B). Die lose Verteilung in der Zellhülle konnte mit Immunogold-markiertem NmPin bestätigt werden, welches in der TEM-Aufnahme als kleine schwarze Punkte im peripheren Bereich der Zelle zu erkennen ist (Abbildung 3-17C).

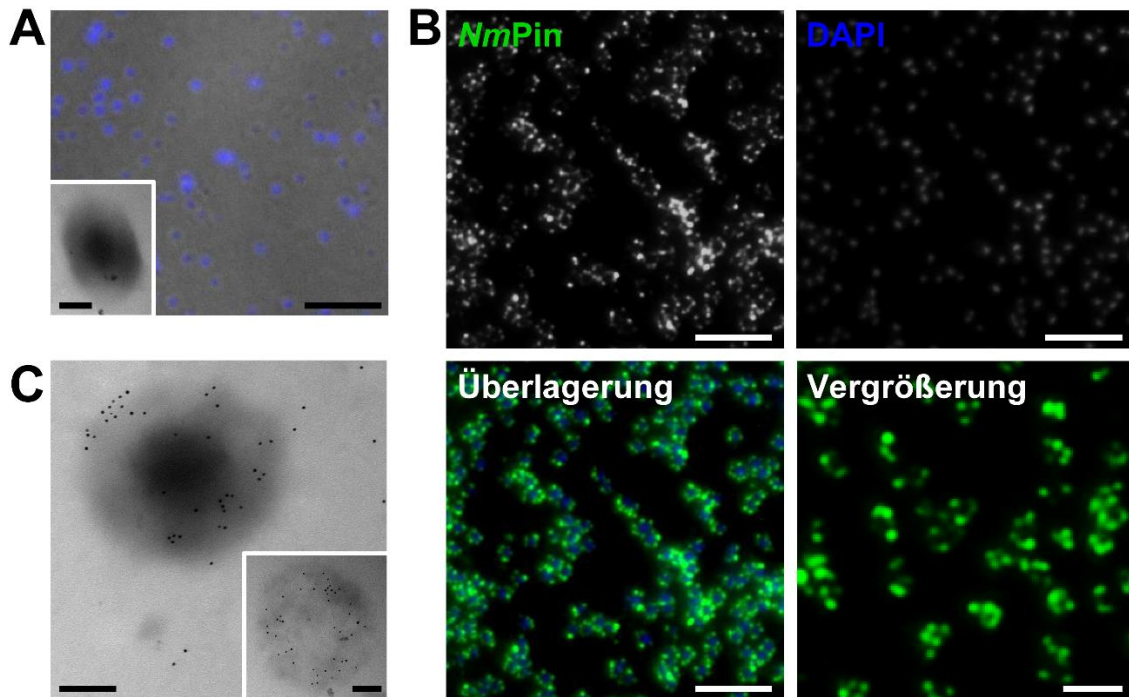


Abbildung 3-17: Mikroskopie von nicht-präfixierten *N. maritimus*-Zellen. (A) Lichtmikroskopische Aufnahme von *N. maritimus*-Zellen im Durchlicht mit DNA-DAPI-Färbung (Balken entspricht 5 μ m). Das kleine Fenster zeigt eine TEM-Aufnahme der runden Zellen (Balken: 100 nm). (B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *N. maritimus* mit immunologischer Färbung von NmPin mit Alexa488 (oben links) und Färbung der DNA mit DAPI (oben rechts). Überlagerung der Fluoreszenz von NmPin-Alexa488 (grün) mit DAPI (blau) im Bild unten links (Balken: 5 μ m). Vergrößerung der NmPin-Alexa488 gefärbten Zellen unten rechts (Balken: 2 μ m) zeigt eine diffuse Verteilung von NmPin in der zerstörten Zellhülle. (C) TEM-Aufnahmen von *N. maritimus*-Zellen mit Immunogoldfärbung von NmPin (schwarze Punkte) zeigen eine ungleichmäßige Verteilung des Proteins in der Zellperipherie. Die Balken repräsentieren 100 nm.

In einem weiteren Ansatz wurden die Zellen vor der Mikroskopie ohne Fixierung aus dem synthetischen Meersalzmedium in PBS-Puffer überführt. TEM-Bilder mit einer Goldmarkierung von NmPin zeigen einen fast vollständigen Verlust von NmPin aus der Zelle bei gleichzeitigem Verlust des S-Layers und einer partiellen Schädigung der Zellmembran (Abbildung 3-18A). Das Fehlen von NmPin konnte mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie bestätigt werden, eine Färbung mit DAPI zeigte jedoch weiterhin DNA in definierten Bereichen (Abbildung 3-18B), was eine vollständige Lyse von *N. maritimus* ausschließt.

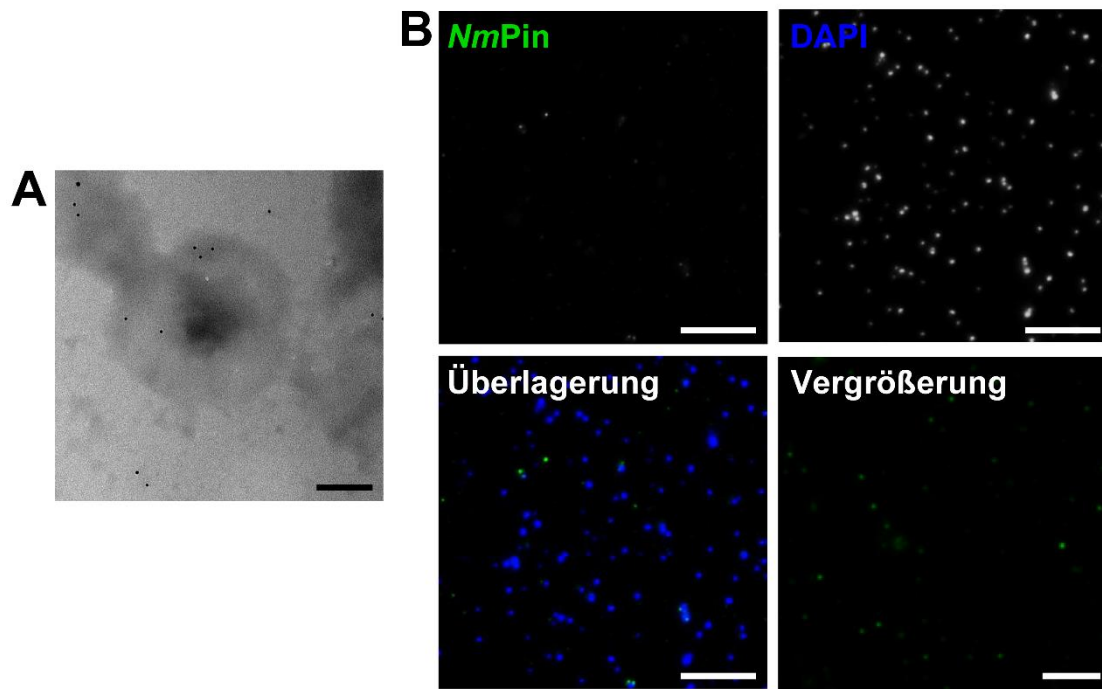


Abbildung 3-18: Mikroskopie von nicht-präfixierten *N. maritimus*-Zellen in Niedrigsalzpuffer. (A) TEM-Aufnahme einer Zelle von *N. maritimus* zeigt den Verlust der Zellhülle und den Verlust von NmPin (schwarze Punkte) über eine Immunogoldfärbung. Der Balken entspricht einer Länge von 100 nm. (B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *N. maritimus* mit immunologischer Färbung von NmPin mit Alexa488 (oben links) und Färbung der DNA mit DAPI (oben rechts). Überlagerung der Fluoreszenz von NmPin-Alexa488 (grün) mit DAPI (blau) im Bild unten links zeigt den Verlust von NmPin aus der Zellhülle (Balken: 5 µm). Vergrößerung der NmPin-Alexa488 gefärbten Zellen unten rechts (Balken: 2 µm).

3.9 NmPin liegt in der Zelle in unmodifizierter Form vor

Als Membran-assoziiertes Protein besteht die Möglichkeit, dass NmPin in der Zelle mit einem Fettsäureanker modifiziert wird, um die Interaktion mit der Lipidschicht zu stabilisieren. Eine hypothetische Modifikation könnte sich an dem einzigen Cysteinrest befinden, da dieser in der Mitte der Lysin-reichen Fläche lokalisiert ist. Einen Hinweis gibt die bioinformatische, sequenzbasierte Vorhersage-Software CSS-Palm. Diese sagt eine Modifikation des Cys8 mit Palmitinsäure voraus. Im Strukturmodell ragt Cys8 jedoch mit der Thiolgruppe in die entgegengesetzte Richtung, in das aktive Zentrum hinein. Um zu untersuchen, ob NmPin in der Zelle modifiziert vorliegt, wurden verschiedene *pulldown*-Studien durchgeführt und die Zielmoleküle massenspektrometrisch analysiert. Als *proof of concept* wurde zunächst eine Immunopräzipitation (IP) mit dem anti-NmPin-Antikörper aus *N. maritimus*-Zelllysaten durchgeführt, bei der rekombinantes NmPin zugesetzt wurde. In dem Gel war der Überschuss an NmPin auf Höhe von 10 kDa auch nach Entfernen der anti-NmPin-gebundenen-Protein A-beads zu erkennen. Damit konnte die erfolgreiche Präzipitation

von *NmPin* und weiteren Co-präzipitierten Proteinen bestätigt werden (Abbildung 3-19A).

In einer weiteren IP mit ausschließlich endogenem *NmPin* konnte die Bande auf der Höhe von 10 kDa im Anschluss an einen Trypsinverdau massenspektrometrisch untersucht werden. In dem Spektrum konnten fünf der sieben zu erwartenden Peptidfragmente aus einem *in silico*-Verdau anhand der Massen zugeordnet werden (Abbildung 3-19B). Das Fragment mit einer Masse von 886,5 Da enthält das Cys8 und konnte mit einer Abweichung von 0,81 % detektiert werden. Die Peptide mit 1013,5 und 502,3 Da konnten nicht zugeordnet werden.

In einem weiteren Ansatz wurde GST-*NmPin* in *N. maritimus*-Lysaten inkubiert und anschließend mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie untersucht. Die *pulldown*-Probe zeigte gegenüber der Kontrolle ohne Inkubation im Lysat eine Schulter mit einer Massendifferenz von 16 Da (Abbildung 3-19C), was einer Oxidation eines Methionins entspräche. Das *pulldown*-*NmPin*-Protein zeigte eine unveränderte Isomeraseaktivität und lies sich wie die Kontrolle mittels chemischer Sondierung am Cystein modifizieren (Daten nicht gezeigt). Um in einem letzten Ansatz auszuschließen, dass die Modifikation aufgrund der dreidimensionalen Struktur von *NmPin* nicht erfolgte, wurde das Motiv um das Cystein synthetisch mit einem C-terminalen Strep-tag hergestellt und mit *N. maritimus*-Zellysaten inkubiert. Das Peptid konnte über den Strep-tag isoliert und massenspektrometrisch analysiert werden. Im Vergleich zum Peptid in reinem Puffer konnte das *pulldown*-Peptid aus den Lysaten vermehrt als Dimer detektiert werden, was auf eine Oxidationsreaktion der Cysteine zu einem Disulfid schließen lässt. Zudem kam es in den Lysaten zu deutlichen Abbaureaktionen, so dass weitere Fragmente mit einem stufenweisen Verlust der N-terminalen Reste gefunden wurden. Eine Modifikation des Cysteins in dem Peptid konnte hingegen nicht beobachtet werden (Abbildung 3-19D).

Abschließend konnte mit einer *NmPin*_{C8A}-Mutante gezeigt werden, dass das Fehlen der Thiolgruppe zu einer deutlichen Verringerung der Isomeraseaktivität auf 4 % der Wildtyp-Aktivität führt (Daten nicht gezeigt), so dass eine dauerhafte Modifikation des Cys8 auch aus funktioneller Sicht *in vivo* unwahrscheinlich ist.

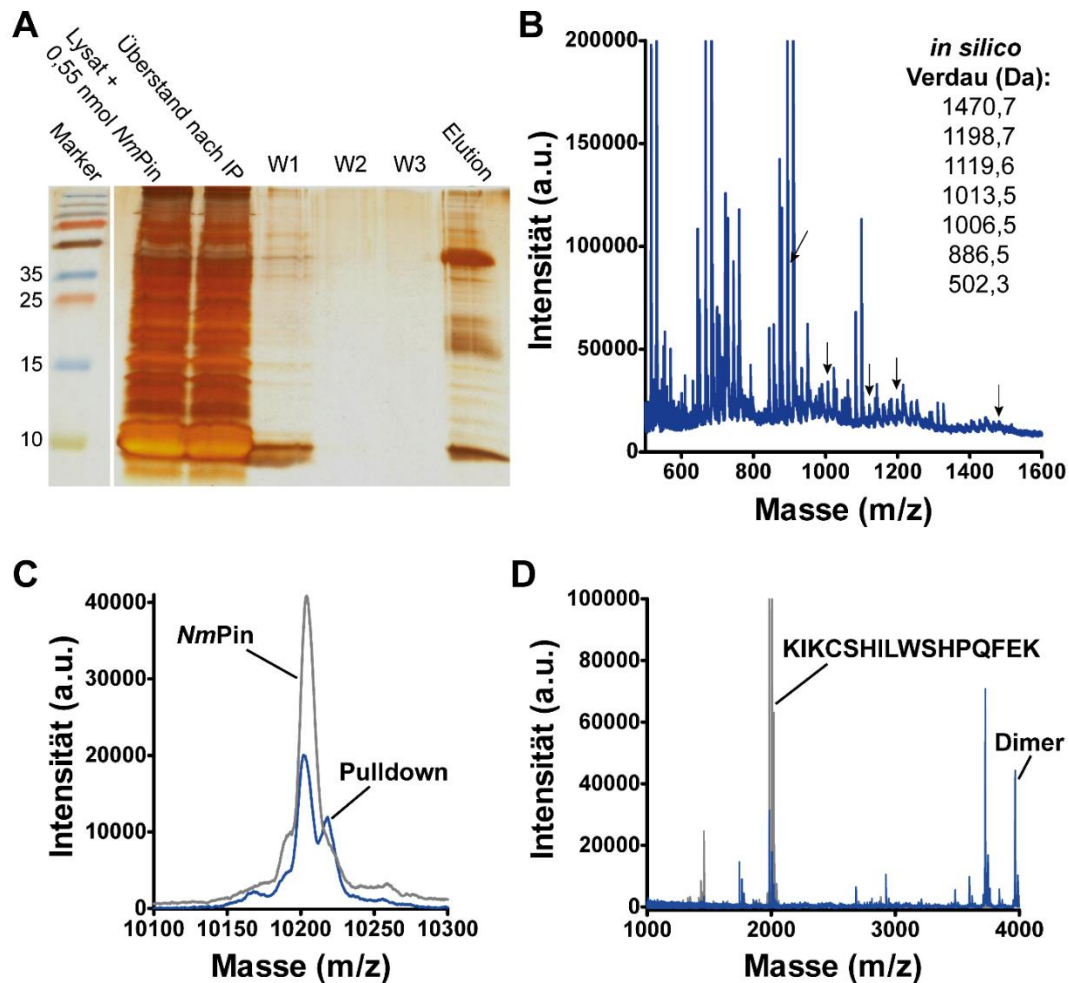


Abbildung 3-19: Untersuchungen von *NmPin* auf hypothetische Modifikationen. (A) Silbergefärbte SDS-PAGE-Analyse einer Immunopräzipitation von rekombinantem *NmPin* nach Inkubation mit *N. maritimus*-Zellessaten. Die Elutionsspur zeigt die erfolgreiche Präzipitation von *NmPin*. (B) MALDI-TOF-Massenspektrum von endogenem, Trypsin-verdaulichem *NmPin* aus einer Immunopräzipitation. Das 886,5 Da Fragment enthält das Cys8. Die Fragmente 1013,5 und 502,3 Da konnten nicht identifiziert werden. (C) MALDI-TOF-Massenspektren von GST-*NmPin* (grau) und GST-*NmPin* nach Inkubation in *N. maritimus*-Zellessaten (blau). Die Inkubation führte zu keiner Modifikation am Cys8, was durch die gleichbleibende Masse bestätigt wird. (D) MALDI-TOF-Massenspektren des synthetischen Peptids KIKCSHILWSHPQFEK (grau) und des gleichen Peptids nach Inkubation in *N. maritimus*-Zellessat (blau).

4 Diskussion

4.1 *NmPin* ist ein aktives, phospho-unabhängiges *single domain*-Parvulin

Durch die Kultivierbarkeit des mesophilen Thaumarchaeoten *N. maritimus* konnte mit *NmPin* im Rahmen dieser Arbeit erstmals ein endogen exprimiertes archaeales Parvulin untersucht werden. Im Unterschied zu einer Reihe von thermophilen und hyperthermophilen Archaeen (118), in deren Genom kein Parvulingen zu finden ist, wird *NmPin* in *N. maritimus* als *single domain* Parvulin (sdPar) unter geeigneten Wachstumsbedingungen exprimiert. Die hochaufgelöste NMR-Struktur von *NmPin* zeigt eine für Parvuline typische Faltung. Gemäß des strukturellen Modells besitzt *NmPin* wie andere Parvulin-Proteine die sequentiellen und topologischen Voraussetzungen für eine Isomeraseaktivität (85). Diese konnte für eine Reihe von unphosphorylierten Substratpeptiden bestätigt werden (Abbildung 3-4C). Im Gegensatz zu eukaryotischen, Phosphat-abhängigen Proteinen (Abbildung 1-3A) wurde das Substrat mit einem phosphorylierten Serin nicht umgesetzt, wodurch *NmPin* der Gruppe der phospho-unabhängigen Parvulinen zugeordnet werden kann (Abbildung 1-3B).

Im Allgemeinen ist die Phosphorylierung von Proteinen als Regulationsmechanismus auch in der Domäne der Archaea zu finden, da eine Reihe von archaealen Organismen offene Leseraster für potentielle Proteinkinasen und Proteinphosphatasen, in Homologie zu humanen Vertretern, aufweisen (147). Die fehlende Aktivität für phosphorylierte Substrate bei *NmPin* lässt sich bereits aus seiner Struktur ableiten, da in dem kleinen, kompakten Protein keine Phosphat-bindende Domäne oder Phosphat-bindende Proteinerweiterung in Form einer *loop*-Struktur zu finden ist. Dies ist bei den Phospho-abhängigen Proteinen Pin1 (Mensch) und ESS1 (*Candida albicans*) der Fall (148, 51, 149). Bei hPin1 werden Phosphoserin- und Phosphothreonin-Prolin-Motive unter Beteiligung der Reste Arg17 und Trp34 der WW-Domäne gebunden (150). Dadurch wird die Interaktion zwischen den Domänen (WW-Domäne und katalytische PPlase-Domäne) geschwächt (151, 152) und ein Phosphat-bindender *loop* mit den Interaktions-relevanten Resten Lys63, Arg68 und Arg69 in der PPlase-Domäne wird aktiviert (62, 151, 56). Eine ähnliche Proteinerweiterung findet sich bei einer Reihe von pflanzlichen Parvulinen aus *Malus domestica*, *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max* und *Lycopersicon esculentum* in Form eines vier Aminosäure langen Einschubs in der

Nähe des aktiven Zentrums, welche die Umsetzung von phosphorylierten Substraten ohne weitere Domäne ermöglicht (153).

Vergleicht man die positive Ladung der an der Phosphatbindung beteiligten Reste der katalytischen Domäne bei hPin1 (Lys63, Arg68 und Arg69) mit der negativen Ladung am aktiven Zentrum von NmPin (Glu83, Asp42) zeigt sich ein weiterer deutlicher Unterschied, der eine Bindung von phosphorylierten Resten an NmPin unwahrscheinlich macht. Diese beiden Reste (Glu83, Asp42) waren in Titrationsstudien an der Bindung eines peptidischen Substrats beteiligt (Abbildung 3-8) und Asp42 ist als Teil der katalytischen Tetrade zudem notwendig für die Umsetzung des Substrats (Abbildung 3-7).

Diese Position in der Tetrade ist innerhalb der Parvuline stets mit einem Aspartat oder einem Cystein besetzt (85). Vergleicht man das Auftreten von Asp oder Cys bei unterschiedlichen Parvulinen, zeigt sich, dass phospho-abhängige Proteine (phos) ausnahmslos ein Cystein an dieser Position tragen. Bei phospho-unabhängigen (nicht-phos) Parvulinen findet sich mit Ausnahme von Par10 aus *E. coli* ein Aspartatrest.

phos	hPin1	(1NMW)	NGYIQKIKSG---EEDFESLASQFSDCSS- AKA ---RGDLGAFS-RGQMOKPFEDASFAL
	TbPin	(2LJ4)	QKWSQRIASG---EVSFEEAASQRSDCGS-YAS---GGDLGFFS-SGEMMKPFEDAVRAL
	AtPin1	(1J6Y)	KSIREDIVSG---KANFEEVATRVSDCSS- AKR ---GGDLGSFG-RGQMOKPFEEATYAL
nicht-phos	CsPinA	(2RQS)	LAVQERLKA----GEKFGKLAKELSIDGGS AKR ---DGSLGYFG-RGKMVKPFEDAAFR
	NmPin	(2M08)	LAIMEKLKS----GEKFGKLAKELSIDGGS AKK ---NGNLGYFT-KGMMVKPFEDAAFKL
	SaPrsA	(2JZV)	EIQKEVSKD----PSKFGEIAKKESMDTGS AKK ---DGELGYVL-KGQTDKDFEKALFKL
	EcPar10	(1JNS)	LDLLEQIKN----GADFGKLAKKHSICPS-GKR---GGDLGEFR-QGQMVPFADKVVVFSC
	hPar14	(3UI4)	MEAMEKLKS----GMRFNVAQAQYSEDK--ARQ---GGDLGWMT-RGSMVGPFEAAAFAL
	BsPrsA	(1ZK6)	EEVEKKLKK----GEKFEDLAKEYSTDSS- ASK ---GGDLGWFAKEGQMDETFSKAAFKL
	EcPpiD	(2KGJ)	KAVLDELNK----GGDFAALAKEKSADII SARN ---GGDMGWLE-DATIPDELKNAGLK-

Abbildung 4-1: Sequenzvergleich verschiedener Parvulindomänen. Vergleich von Phosphat-abhängigen Parvulinen (phos) und Phosphat-unabhängigen Parvulinen (nicht-phos) in Hinblick auf einen durch Cys oder Asp belegten Aminosäurerest (roter Rahmen) innerhalb der katalytischen Tetrade. Mit Ausnahme von Par10 aus *E. coli* lässt sich allein durch diesen Rest deutlich zwischen phos und nicht-phos Parvulinen unterscheiden.

Die Oxidation des Cys113 der katalytischen Tetrade des Phosphat-abhängigen hPin1 zu einer Sulfinsäure konnte mit einer deutlich verringerten Aktivität und dem Auftreten von neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer in Verbindung gebracht werden, während eine deutlich schwächer aktive C113D-Mutante unter oxidativen Bedingungen katalytisch aktiv blieb (154, 155). Die Isomeraseaktivität von NmPin für das unphosphorylierte Substrat Suc-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA war hingegen unverändert zwischen dem Wildtyp und einer D42C-Mutante (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise

zeigt sich in der Belegung dieser Position (Asp oder Cys) ein evolutiver Substratshift, der bei eukaryotischen Organismen mit einem größeren PPlase-Repertoire die Fähigkeit hervorbringt, phosphorylierte Motive binden zu können. Mit dieser Fähigkeit würden erstmals auch die regulativen Möglichkeiten von reversiblen Phosphorylierungen erworben. Bei prokaryotischen Organismen mit einem geringen PPlase-Repertoire könnte hingegen das Risiko einer oxidativen Inaktivierung zu gewichtig sein.

NmPin zeigt eine Präferenz für Substrate, die ein Arg-Pro- oder ein Leu-Pro-Motiv besitzen, während die anderen getesteten unphosphorylierten Substrate mit deutlich verringerten Katalyseraten umgesetzt werden (Abbildung 3-4C). Ein nahezu identisches Substratspektrum ist für die PPlase hPar14 beschrieben, welche auch hinsichtlich der Topologie des aktiven Zentrums eine große Ähnlichkeit zu *NmPin* aufweist (79) (Abbildung 4-2A). Ein Unterschied liegt lediglich in der katalytischen Effizienz der beiden Proteine, welche bei *NmPin* um den Faktor 500 erhöht ist (hPar14: $k_{cat}/K_M = 1,01 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (79); *NmPin*: $k_{cat}/K_M = 5,66 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für Suc-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA).

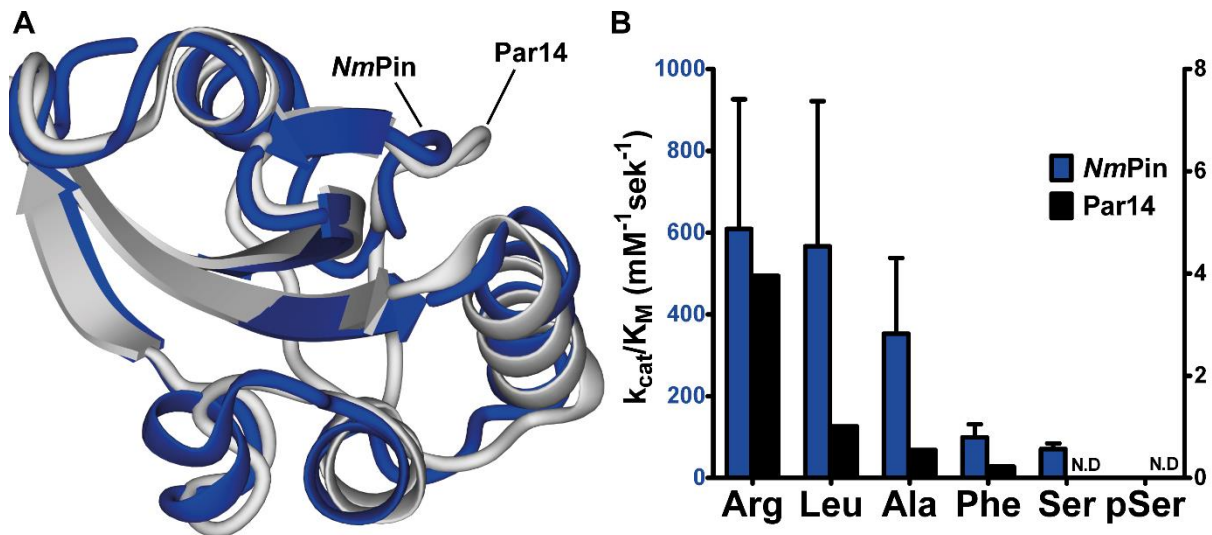


Abbildung 4-2: Vergleich von *NmPin* mit hPar14. (A) Strukturüberlagerung von *NmPin* (blau; PDB ID: 2M08) mit hPar14 (grau; PDB ID: 3U14) zeigt die hohe strukturelle Homologie der beiden Parvuline. (B) Balkendarstellung der katalytischen Effizienz k_{cat}/K_M von *NmPin* (blau) und hPar14 (schwarz; (79)) für verschiedene Substrate mit dem Gerüst Suc-Ala-Xaa-Pro-Phe-pNA.

Die Beobachtung, dass *NmPin* und hPar14 für die getesteten Motive ein identisches Substratspektrum besitzen (Abbildung 4-2B) lässt eine weitreichende Konservierung der Substraterkennung vermuten und bekräftigt damit eine Reihe von

phylogenetischen Studien zu einem archaealen Ursprung der Eukaryoten (156–162). Hinsichtlich der Verwandtschaftsverhältnisse der Domänen des Lebens existieren zwei gängige Hypothesen. Nach Woese *et al.* (163) werden alle Organismen in die drei Domänen Bakterien, Eukaryoten und Archaeen unterteilt, wobei Eukaryoten und Archaeen einen gemeinsamen Vorfahren besitzen, der kein Vorläufer der modernen Bakterien ist. Nach der Eocyten (heute Crenarchaeoten)-Hypothese (164) befinden sich die Eukaryoten als Schwestergruppe zu dem Superphylum TACK, bestehend aus Thaumarchaeota, Aigarchaeota, Crenarchaeota und Koryarchaeota. Danach werden lediglich die beiden Domänen Bakterien und Archaeen/Eukaryoten unterschieden (Abbildung 4-3). Die Entdeckung einer weiteren Gruppe innerhalb des TACK-Superphylums, die Lokiarchaeota, belegte noch weitaus größere Gemeinsamkeiten mit Eukaryoten. Danach besitzen Lokiarchaea als bisher einziges prokaryotisches Phylum das in Eukaryoten vorhandene Protein Aktin (165). Auf bioinformatischer Ebene konnte bereits gezeigt werden, dass sich archaeale *single domain* Parvuline (sdPars) dazu eignen, auf ihrer Basis phylogenetische Verhältnisse zu berechnen (118). Die großen Gemeinsamkeiten zwischen NmPin und hPar14 geben daher einen weiteren Hinweis auf Proteinebene, durch den die engere Verwandtschaft zwischen Eukaryoten und Archaeen im Rahmen der Eocyten-Hypothese gestützt wird.

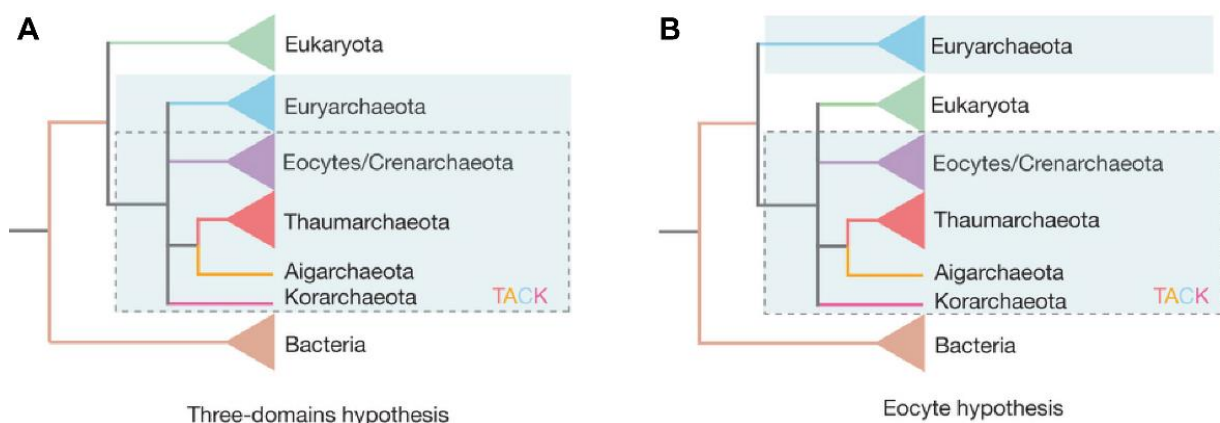


Abbildung 4-3: Phylogenetische Verwandtschaft von Archaeen und Eukaryoten. (A) Stammbaum zur Drei-Domänen-Hypothese mit Bacteria, Archaea und Eukaryota als Domänen des Lebens. Eukaryota und Archaea haben einen gemeinsamen Vorfahren, der kein Vorfahre der Bacteria ist. (B) Stammbaum zur Eocyten/Crenarchaeoten-Hypothese mit zwei Domänen, Bacteria und Archaea/Eukaryota. Eukaryota stellt dabei eine Schwestergruppe des TACK-Superphylums dar. Abbildung modifiziert nach (158).

4.2 Substrate werden über ein hydrophobes Netzwerk in Position gebracht

Der Mechanismus, mit dem PPlasen die Rotation der Peptidyl-Prolyl-Bindung um $\pm 180^\circ$ (*trans*: $\omega = 180^\circ$; *cis*: $\omega = 0^\circ$; Übergangszustand (TS): $\omega = \sim 90^\circ$) katalysieren, wird kontrovers diskutiert (zusammengefasst in: (27)). Die Affinität zwischen Enzym und Substrat ist am höchsten, wenn sich die Xaa-Pro Bindung mit 0° im Übergangszustand befindet und damit die Energiebarriere der Rotation verringert wird (Abbildung 4-4A; (166)). Eine Reihe von Mechanismen wurde postuliert, wie eine Stabilisierung des Übergangszustands erfolgen kann (Abbildung 4-4B). Die Bereitstellung einer hydrophoben Umgebung durch ein entsprechendes Lösungsmittel führt bereits zu einer Erhöhung der Isomerisierungsrate um den Faktor 60, vermutlich aufgrund eines verringerten Einflusses von polaren Gruppen auf die Ladungsverteilung der Amidbindung (167, 168). Der Energiegewinn der Desolvatation der Bindung wurde mit 1,3 kcal/mol berechnet und macht damit nur einen Bruchteil der Verringerung der Aktivierungsenergie aus, die eine PPlase bei der Katalyse bewirkt (169). Der Effekt konnte jedoch auch auf Proteinebene bestätigt werden. Mehrere nicht-PPlase-Proteine, mit einer Kavität der Größe der Substratbindetasche von FKBP12 wurden gefunden, die bis zu 5 % der Isomeraseaktivität von FKBP12 besaßen (170).

Ein weiterer Faktor könnte die Beteiligung eines Wassermoleküls sein, welches in der Kristallstruktur der PPlase Cyclophilin18 im Komplex mit dem Ala-Pro-Dipeptid (171), sowie in der Kristallstruktur von Par14 (PDB ID: 3UI4) gefunden wurde und die Hypothese einer Lösungsmittel-assistierten Katalyse unterstützt. Verschiedene Szenarien einer Wasserbeteiligung sind denkbar, wie die Bildung einer Wasserstoffbrücke zum Carbonylsauerstoff des Prolins, die Stabilisierung des Carbenium-Kations im Übergangszustand unter Beteiligung einer Base oder die Fluktuation des Wassermoleküls in und aus der hydrophoben Tasche als thermodynamische Triebkraft (zusammengefasst in (27)). In einer aktuellen Studie konnten zwei konservierte Wasserbindestellen in hPin1 identifiziert werden, wovon ein Wassermolekül für die Stabilität und Funktionalität eines Wasserstoffbrücken-Netzwerkes im aktiven Zentrum maßgeblich zu sein scheint (172). Darüber hinaus wurde der Einfluss von einzelnen Aminosäureresten auf die Katalyse diskutiert, wie die Guanidiniumgruppe des Arg55 in Cyclophilin18, welche als Wasserstoffdonor für das freie Elektronenpaar am Prolinstickstoff im Übergangszustand fungieren könnte (133).

Für hPin1 wurde ein neuartiger Mechanismus unter Beteiligung eines nukleophilen Angriffs vom Cys113 auf den Carbonylkohlenstoff des Substratprolins vorgeschlagen (56). Die Thiolgruppe des Cysteins würde in diesem Modell von der Seitenkette des His59 deprotoniert und damit für den Angriff aktiviert. Die Aktivierungsenergie des verbindigen Übergangszustands würde deutlich reduziert und damit die Rate der *cis/trans*-Isomerisierung erhöht. Gegen diesen Mechanismus spricht die Beobachtung, dass das zu Cys113 homologe Cys70 in Pin1 *At* aus *A. thaliana* von der hydrophoben Prolinbindetasche wegzeigt und eine Beteiligung eine kovalente Bindung zum Substrat unwahrscheinlich macht (49). Nichtsdestotrotz wird eine Beteiligung des Cys113 an der Katalyse in Verbindung mit einem Netzwerk aus weiteren polaren Resten zur Umorganisation von Protonen in weiteren experimentellen und bioinformatischen Studien bestätigt (173–175, 85).

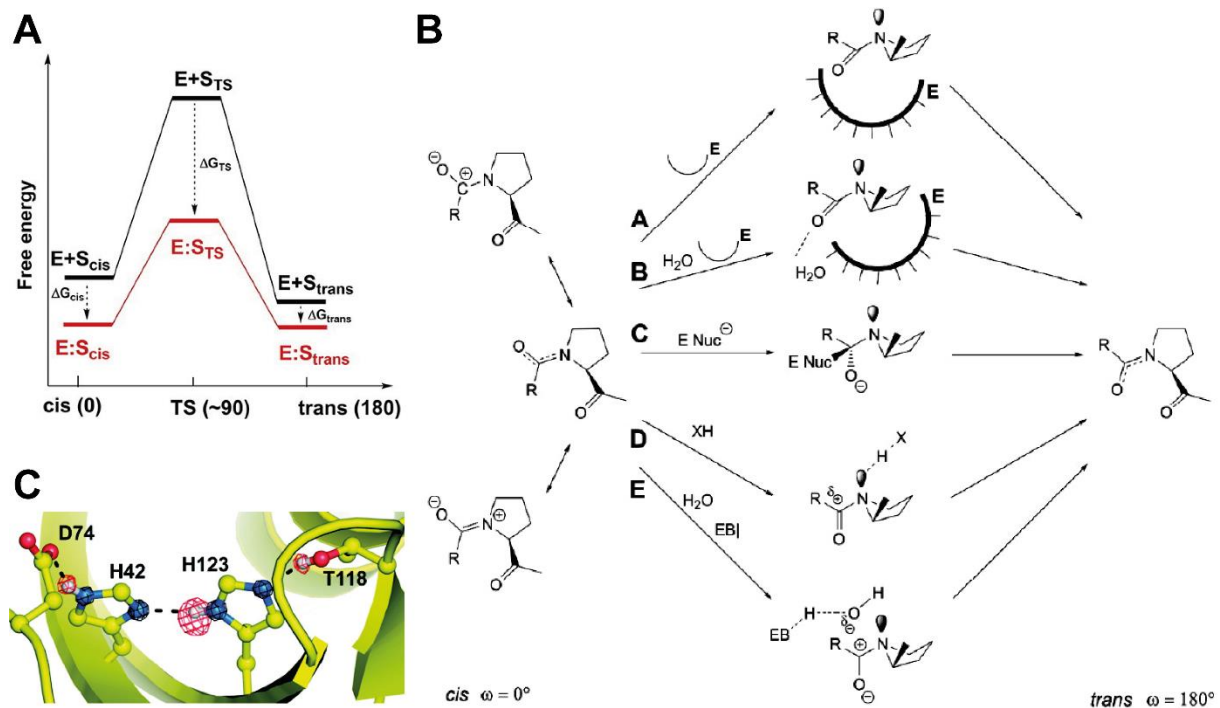


Abbildung 4-4: Mechanismus von PPIase-katalysierten Reaktionen. (A) Diagramm zur Freien Energie in Abhängigkeit der Xaa-Pro-Konformation. Unterschieden wird zwischen *cis*Pro ($\omega=0^\circ$), Übergangszustand (TS) ($\omega \approx 90^\circ$) und *trans*Pro ($\omega=180^\circ$) im ungebundenen Zustand des Substrats (E+S, schwarz) und im Enzym-Substrat-Komplex (E:S, rot). Die größte Energieverringerung zwischen gebundenem und ungebundenem Zustand findet sich im Übergangszustand. Abbildung nach (166). (B) Schematische Darstellung potentieller Katalysemechanismen der Isomerisierungsreaktion zwischen *cis*Pro und *trans*Pro Peptidbindungen. Abbildung nach (27). (C) Strukturmodell eines Protonennetzwerks entlang der katalytischen Tetrade (D74-H42-H123-T118) von hPar14. Abbildung nach (85).

Unabhängig vom Mechanismus der Katalyse lässt sich bei allen PPlasen eine sehr ähnliche Struktur des aktiven Zentrums mit zwei einheitlichen Elementen finden, einer hydrophoben Prolinbindetasche und einem Netzwerk aus polaren Resten (27).

Bei *NmPin* kam es zu einer Interaktion zwischen dem Substrat und den Amidprotonen der Reste Asp42, Lys47, Gly53, Met60, Val61, Ala68, Glu83, Tyr86, Ile88. Anhand der Projektion dieser Aminosäuren auf die Struktur (Abbildung 3-8B) lässt sich erkennen, dass die Reste Met60, Val61, Ala68, Tyr86 und Ile88 an der Ausbildung einer hydrophoben Tasche beteiligt sind. Ein Austausch des Val61 zu einem Alanin führte zu einer nahezu vollständigen Inaktivierung des Enzyms, während der Austausch zu einem Threonin eine Restaktivität von 30 % aufwies. Diese Beobachtung legt nahe, dass ein genau definiertes Ausmaß einer hydrophoben Tasche einen größeren Einfluss auf die Funktionalität des Enzyms hat als die Hydrophobizität alleine. Entsprechend könnte die Threoninmutante mit einer γ -Methylgruppe und trotz einer polaren Hydroxygruppe das Valin besser ersetzen, als eine Alaninmutante mit hydrophober, aber verkürzter Seitenkette. Tatsächlich zeigte sich bei der Bindung des Prolinanalogs DTT_{ox} an *NmPin*-Wildtyp eine Beteiligung der Methylgruppen der verzweigten Seitenketten der vier Reste Leu12, Ile41, Leu52 und Val61 (Abbildung 3-12A/B). Diese Kontakte waren deutlich schwächer für die Mutante V61T und fehlten nahezu vollständig für das inaktive V61A-Protein. Die größten verbleibenden Resonanzänderungen bei Zugabe von DTT_{ox} waren für das peripher gelegene I41 zu beobachten (Abbildung 3-12D). Daraus lässt sich ein Modell ableiten, bei dem die hydrophoben Seitenketten als Klammern fungieren, um den Pyrrolidinring des Prolins passend in der hydrophoben Tasche zu positionieren und für eine Rotation um die Amidbindung zu fixieren (Abbildung 4-5). Fehlt eine der drei Klammern (Leu12, Leu52, Val61), bindet das Substrat zu locker für einen effektiven Isomerisierungsprozess.

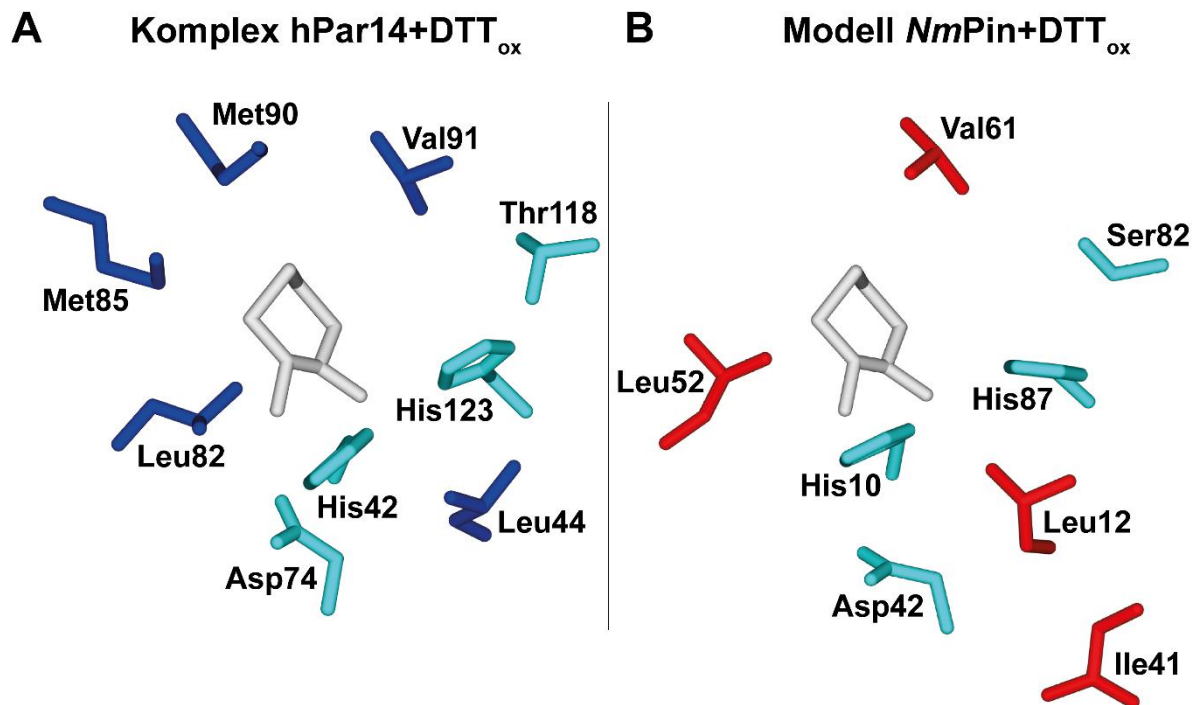


Abbildung 4-5: Substratfixierung im aktiven Zentrum von PPlasen. (A) Ausgewählte aliphatische hydrophobe Seitenketten (blau) im aktiven Zentrum von hPar14 in direkter Nachbarschaft zu dem prolinanalogen Liganden DTT_{ox} (grau) und der katalytischen Tetrade (cyan) in der Kristallstruktur (PDB ID: 3UI6). (B) Strukturmodell von NmPin (PDB ID: 2M08) mit hydrophoben Seitenketten (rot), die an der Bindung von DTT_{ox} (grau) beteiligt sind. Über ein hydrophobes Netzwerk fixiert, wird der Ligand in definierter Position zur katalytischen Tetrade (cyan) ausgerichtet.

4.3 Der S-Layer gibt die Zellform von *N. maritimus* vor

Bei einzelligen Organismen übernimmt die Zellhülle Funktionen wie mechanischer Schutz und Stabilität, die bei Zellen, welche in Verbänden oder Geweben organisiert sind, von untergeordneter Rolle sind. Aus diesem Grund ist eine Vielzahl von Prokaryoten mit einer besonderen Zellhülle ausgestattet, einer dünnen Schicht aus einem faserigen, viskoelastischen Material, welche dem Turgor der Zelle entgegenwirkt und damit die Form der Zelle bestimmt (176, 177). Im Unterschied zu Bakterien, die außerhalb der Cytoplasmamembran eine polymere Peptidoglycanschicht besitzen, findet man bei der Mehrzahl der Archaeen eine kristalline Proteinschicht als Zellhülle (178, 179). In den meisten Fällen besteht dieser *surface layer* (S-Layer) aus nur einer Protein- oder Glykoproteinspezies und gilt als wichtiger Stabilisator der Zellform und Schutz vor osmotischem Stress, obwohl einige Archaeen komplett ohne S-Layer auskommen (180). In den TEM-Aufnahmen von präfixierten, stäbchenförmigen *N. maritimus* Zellen lässt sich ein S-Layer erkennen, welcher auch in einer kryoelektronentomographischen Aufnahme des

Thaumarchaeoten zu sehen ist (Abbildung 4-6A, Dr. Grant Jensen, Dr. Ziheng Yu, CalTech Pasadena, USA). Eine hochaufgelöste Kryoelektronentomographie des S-Layers (Dr. Grant Jensen, Dr. Ziheng Yu, CalTech Pasadena, USA) zeigt darüber hinaus, wie hoch geordnet und symmetrisch die Bestandteile der Hülle angeordnet sind (Abbildung 4-6B).

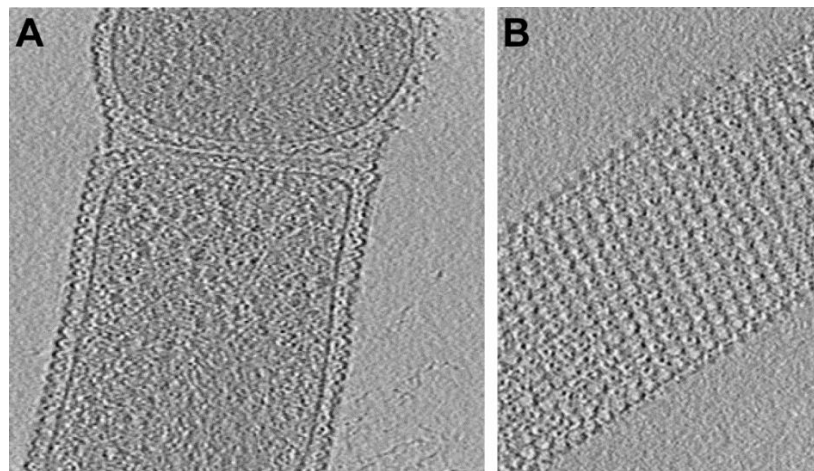


Abbildung 4-6: Mikroskopie des S-Layers von *N. maritimus*. (A) Kryoelektronentomographische Aufnahme von *N. maritimus*-Zellen. (B) Kryoelektronentomograph des S-Layers von *N. maritimus*. (beide Aufnahmen von Dr. Grant Jensen, Dr. Ziheng Yu).

N. maritimus-Zellen, die nicht präfixiert wurden, fehlt der S-Layer und die Zellen verlieren die charakteristische Stäbchenform. Die mechanische Schädigung beim Zentrifugieren der Zellen könnte zu einem Reißen des S-Layers geführt haben, wodurch die formgebende Hülle ihre Funktion verloren hat.

Die genaue physiologische Funktion des S-Layers von *N. maritimus* bleibt weiterhin unklar. Denkbar ist ein Schutz vor Fraßfeinden und Viren oder eine Anpassung, um den Transfer von Metaboliten aus der Zelle in Phasen mit knappen Nahrungsvorkommen zu minimieren. Letzteres spielt in einem offenen, marinen Lebensraum eine entscheidende Rolle, zumal für *N. maritimus* eine Anpassung an ein extrem limitiertes Nahrungsangebot gezeigt werden konnte (113).

Eine weitere interessante Funktion könnte die Bereitstellung eines extracytoplasmatischen Kompartiments zwischen Membran und S-Layer sein. Ein solcher zusätzlicher Reaktionsraum würde unter anderem den kontrollierten Aufbau eines chemiosmotischen Gradienten zur ATP-Gewinnung ermöglichen (181). Mit Hilfe extrazellulärer Proteine könnte zudem eine vorgeschaltete Stressantwort bereitgestellt

werden, wie es bei Gram-negativen Bakterien für das Periplasma beschrieben ist (182, 183).

4.4 *NmPin* ist zwischen S-Layer und Zellmembran lokalisiert

Ein prominenter Unterschied zwischen Bakterien, Eukaryoten und Archaeen liegt in dem Aufbau der Membranlipide. Bei Archaeen findet man als hydrophoben Teil der Membran Isoprenoidketten, welche über eine Etherbindung an ein Glycerol-1-phosphat (G1P)-Rückgrat gebunden sind. Bei Bakterien und Eukaryoten kommt das Enantiomer des G1P zum Einsatz, ein Glycerol-3-phosphat, an das Fettsäuren über Esterbindungen gebunden sind (184). Neben der Diether-Lipid-Struktur sind Tetraether-Lipide bekannt, bei denen die Isoprenoide an beiden Enden an ein G1P gebunden sind, welche als beidseitig hydrophile Moleküle Einfachschicht-Membranen ausbilden (185). Die Cytoplasmamembran von Crenarchaeen und Thaumarchaeen besteht aus Glycerol-dibiphytanyl-glycerol-tetraethern (GDGT), bei denen die Biphytanyle internal zu Cyclohexanen oder Cyclopentanen cyclisieren können. Im Fall eines Cyclohexans und vier Cyclopentanen entsteht Crenarchaeol, dem häufigsten GDGT innerhalb dieser Organismen (144, 186, 187). Auch bei dem Thaumarchaeon *N. maritimus* bildet das Kernlipid Crenarchaeol den Hauptbestandteil der Zellmembran (143). Als Ganzes wird die Membran von intakten, polaren Lipiden (IPL) gebildet, mit negativ geladenen Phospho-, Glyko- oder Phosphoglyko-Kopfgruppen am G1P (143), wodurch eine passende Fläche bereitsteht, um den Lysin-reichen Bereich von *NmPin* zu binden. Im Gegensatz zu DNA-bindenden Proteinen, welche in den meisten Fällen eine basische Fläche mit deutlicher Krümmung aufweisen, besitzt *NmPin* eine für Membranbindungen bekannte plane Lysin-reiche Fläche (188, 189). Die Bindung von Lipidvesikeln *in vitro* und der Verlust der Bindungsfähigkeit durch Mutation des konservierten Lys7 zu Glutamat bekräftigen eine vermutete Interaktion zwischen der Lysin-reichen Fläche von *NmPin* und den IPL (Abbildung 3-14).

Da für endogenes *NmPin* keine Modifikation in Form eines Lipidankers oder einer Erweiterung des Proteins durch Transmembranhelices gefunden wurden, ist auch *in vivo* von einem elektrostatischen Bindungsmechanismus auszugehen. Damit unterscheidet sich *NmPin* von den beiden bekannten Membran-gebundenen, bakteriellen Parvulinen PrsA aus *B. subtilis* und PpiD aus *E. coli*. PrsA besitzt einen Lipidanker an einem N-terminal gelegenen Cystein, mit dem es von außen in der

Zellmembran fixiert ist (91, 93, 90), während PpiD mit einer N-terminalen Transmembranhelix von außen in der Cytoplasmamembran verankert ist (102). In humanen Zellen sind für unterschiedliche nicht-Parvulin-Proteine unspezifische elektrostatische Interaktionen zwischen einer Ansammlung von positiv geladenen Resten des Proteins und den negativ geladenen Phospholipiden der Membran beschrieben, die eine wichtige Rolle bei der Regulation und Aktivität der Proteine spielen (188).

NmPin ist in *N. maritimus*-Zellen mit intaktem S-Layer in hoher Dichte gleichmäßig in der Zellhülle verteilt (Abbildung 3-16B). Es ist davon auszugehen, dass die Lokalisation von *NmPin* durch die allgemeine Proteinsekretion (Sec-Weg) für ungefaltete Proteine oder mittels der Twin-Arginin-Translokase (Tat-Weg) für gefaltete Proteine erfolgt (190–193).

Zellen mit mechanischer Beschädigung des S-Layers (runde Zellform) zeigen bereits eine deutliche Verringerung der gleichmäßigen Proteinverteilung (Abbildung 3-17B). In Zellen, die zusätzlich mit PBS osmotisch gestresst werden, ist kaum *NmPin* zu finden (Abbildung 3-18B). Es ist anzunehmen, dass *NmPin* in einem „quasi-periplasmatischen-Raum“ (194, 195) zwischen der Zellmembran und dem S-Layer lokalisiert ist (Abbildung 4-7A). Die Beschädigung des unfixierten S-Layers in Zellen mit runder Zellform führt in diesem Modell zu einer Unordnung in der Verteilung des elektrostatisch gebundenen *NmPin* oder einer partiellen Diffusion innerhalb der Zellhülle (Abbildung 4-7B). Der Einfluss der Niedrigsalzumgebung (PBS) führt durch Erhöhung des Turgordrucks zu einem vollständigen Verlust der Zellhülle und einem Ablösen von *NmPin* durch Competition der negativ geladenen Lipidkopfgruppen mit den freien Phosphationen des Lösungsmittels (Abbildung 4-7C) (196).

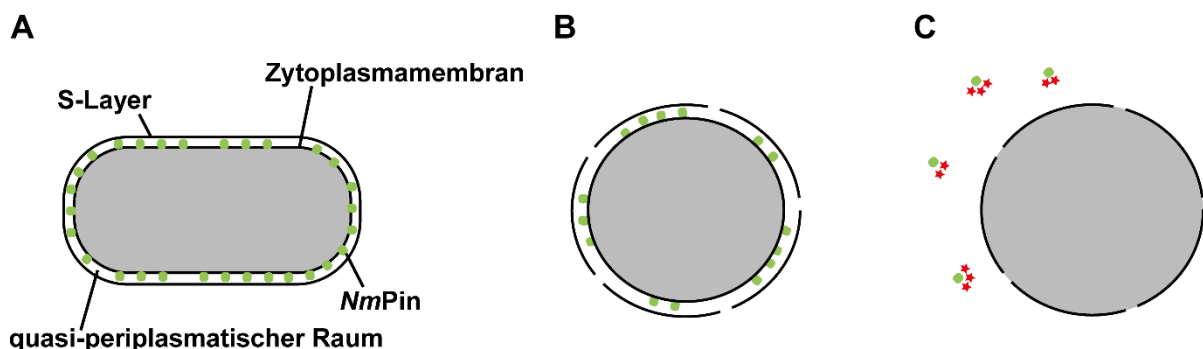


Abbildung 4-7: Lokalisierungsmodell von *NmPin* in *N. maritimus*. (Legende auf der folgenden Seite)

Abbildung 4-8: (Abbildung auf der vorherigen Seite)

(A) Schematische Darstellung einer intakten (präfixierten) *N. maritimus*-Zelle mit *NmPin* (grüne Kugeln) lokalisiert im quasi-periplasmatischen Raum zwischen *S-Layer* und Cytoplasmamembran. (B) Schematische Darstellung einer nicht-präfixierten, mechanisch geschädigten Zelle mit diffuser Verteilung von *NmPin* (grüne Kugeln) in der Zellhülle. (C) Schematische Darstellung einer nicht-präfixierten, mechanisch und osmotisch geschädigten Zelle. Ohne *S-Layer* kann *NmPin* (grüne Kugeln) von Phosphationen (rote Sterne) von der Cytoplasmamembran abgelöst werden.

4.5 Die Funktion von *NmPin*

Die höchste Konzentration von *NmPin* in der Zellhülle konnte für *N. maritimus*-Zellen mit einem intakten *S-Layer* in Meersalzmedium gezeigt werden (Abbildung 3-16), während mechanisch und osmotisch gestresste Zellen verringerte Mengen an *NmPin*-Protein aufwiesen (Abbildung 3-17, Abbildung 3-18). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass *NmPin* nicht in einer stressbedingten Stoffwechselantwort vorkommt, sondern wie die bakteriellen PPlasen PrsA (50), PpiD (102) und SurA (197, 198) in der Faltung und Reifung von extrazellulären, (pseudo-)periplasmatischen oder äußeren Membranproteinen beteiligt ist. Wie Eukaryoten und Bakterien sind auch Archaeen darauf angewiesen, Proteine über die Zellmembran zu transportieren, um dort Aufgaben wie Nährstoffaufnahme, Biotransformation oder die Aufrechterhaltung der extrazellulären Struktur zu übernehmen (199). Auf Grundlage von Sec- und Tat-Konsensussequenzen wurden 24 archaeale Genome untersucht, wobei 7105 potentielle Exportproteine gefunden wurden. Nur acht dieser Kandidaten enthielten ein Tat-Signal, so dass die überwiegende Mehrheit des Sekretoms vermutlich ungefaltet über den Sec-Weg transportiert wird (199). Diese Ergebnisse decken sich mit der Beobachtung, dass der Tat-Weg und damit die Sekretion von Proteinen in einem vollständig gefalteten Zustand in den meisten Prokaryoten nicht zum Überleben notwendig ist (191). Der Großteil der sekretierten Proteine muss entsprechend im Anschluss an die Translokation extrazellulär gefaltet werden, wobei Faltungshelfern wie PPlasen eine wichtige Funktion zukommt (190).

Eine kleine Anzahl von cytoplasmatischen PPlasen, FKBP's und Cyclophiline, wurde auch für die Domäne Archaea beschrieben (200), sowie die Struktur eines crenarchaealen Parvulins aufgeklärt (52). *NmPin* ist jedoch die erste aktive, extrazellulär lokalisierte PPlase, welche die wichtige Rolle als Faltungshelfer sekretierter Proteine übernehmen kann. Durch die im Gegensatz zu phospho-abhängigen PPlasen breite Substraterkennung (Abbildung 3-4C) und die gleichmäßige Verteilung in der Zellhülle (Abbildung 3-16B) sind wichtige Voraussetzungen erfüllt, um eine große Anzahl an extrazellulären Proteinen zu falten.

Eine andere mögliche Funktion von *NmPin* könnte die Aufrechterhaltung der hohen Ordnung und Symmetrie der *S-Layer*-Proteine sein (Abbildung 4-6A/B). Hinweise dazu kommen aus dem *S-Layer*-Glykoprotein-Komplex Tetrabrachion aus dem hyperthermophilen Crenarchaeoten *Staphylothermus marinus*. Dieser Proteinkomplex ist strukturell in einen rechtshändigen *supercoil*-Abschnitt und einen linkshändigen *supercoil*-Abschnitt unterteilt, welche durch einen charakteristischen Prolinrest in einem V-I-P-K-F Motif voneinander getrennt werden (201, 202). Es ist davon auszugehen, dass die richtige Konformation des Prolins einen wichtigen Einfluss auf die korrekte Struktur und Funktion des *S-Layers* hat und durch die Anwesenheit einer entsprechenden PPIase nicht von thermischen Isomerisierungsprozessen abhängig ist.

Im genomischen Kontext der Nachbarschaft von *nmpin* (uniprot ID: Nmar_0942) finden sich weitere Gene, die für Proteine der Zellhülle kodieren. Nmar_0938 kodiert für eine hypothetische UbiA Prenyltransferase, ein Transmembranprotein, welches Terpenreste posttranslational an Cysteinreste von Proteinen heftet und damit hilft, diese Proteine in der Membran zu verankern. Nmar_0940 kodiert für ein hypothetisches Protein, welches 35,8 % Sequenzidentität zu dem bakteriellen Protein PilT aus *Caenispirillum salinarum* aufweist. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von PilT für die Kontraktion des Pilus und damit für die Fortbewegung von Gram-negativen Bakterien notwendig ist (203). Auch für Archaeen existieren Pili-ähnliche Oberflächenstrukturen, die eine Fortbewegung ermöglichen (192). Das archaeale Flagellum in Crenarchaeoten wird beispielsweise durch das *fla*-Operon, ein Genlokus aus 8-10 Genen kodiert (204). Entsprechende Strukturen oder Mechanismen der Fortbewegung sind für *N. maritimus* bisher nicht beschrieben, eine Beteiligung von *NmPin* an der Faltung von Motilitätsproteinen ist jedoch nicht auszuschließen.

5 Ausblick

Die genaue Funktion von *NmPin* in der Zellhülle von *N. maritimus* ist weiterhin unklar, da keine *in vivo*-Substrate oder Interaktionspartner bekannt sind. Mit Hilfe von Co-Immunopräzipitationen in Verbindung mit einem chemischen *crosslink* müssten in weiterführenden Studien Moleküle, die mit *NmPin* interagieren isoliert und massenspektrometrisch untersucht werden. Alternativ bietet sich an, den vollständigen *S-Layer* von *N. maritimus* zu isolieren und darin enthaltene Proteine zu identifizieren. Anhaltspunkte für Substrate von *NmPin* könnten im Anschluß über enthaltene Arg-Pro- oder Leu-Pro-Motive gewonnen werden.

Im Gegensatz zu den bakteriellen, membranständigen Parvulinen PpiD und PrsA verfügt *NmPin* über einen für Parvuline neuartigen Bindungsmodus an die Membran ohne Unterstützung eines Lipidankers. In zukünftigen Studien sollte die zugrundeliegende Interaktion zwischen *NmPin* und der *N. maritimus*-Zellmembran detailliert untersucht werden. Dazu bieten sich NMR-Titrations von [¹⁵N, ¹³C]-*NmPin* mit isolierten *N. maritimus*-Lipiden an, bei denen gezielt auf Aminosäureseitenketten von interagierenden Resten geschaut wird.

Ein weiterer interessanter Aspekt bei Parvulinen ist das Spektrum an Substraten, die gebunden und katalysiert werden können. Insbesondere die Entstehung der Fähigkeit phosphorylierte Motive zu binden, sollte künftig genauer untersucht werden. *NmPin* bietet sich als einfach aufgebautes, katalytisch aktives und nicht-phosphospezifisches Parvulin als Ausgangspunkt für Mutationsstudien an, um eine Phospho-Bindung modellhaft zu erzeugen. In der Nähe des aktiven Zentrums der Mutante D42C könnte ein basischer *loop* mit variabler Länge eingebaut werden, wie er von pflanzlichen Vertretern bekannt ist. Resultierende Proteine können anschließend auf ihre Fähigkeit untersucht werden, phosphorylierte Substrate binden und umzusetzen zu können.

6 Zusammenfassung/Abstract

Peptidyl-Prolyl-Bindungen (Xaa-Pro) nehmen eine Sonderstellung innerhalb von Peptiden und Proteinen ein, da sie im Gegensatz zu nicht-prolinhaltigen Peptidbindungen stabile *cis*-Isomere ausbilden können. *Cis*-ständige Xaa-Pro-Bindungen nehmen je nach Position innerhalb eines Proteins großen Einfluss auf dessen dreidimensionale Struktur und Funktion. Enzyme, welche die Rotation zwischen *cis*- und *trans*-Isomeren katalysieren, werden Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPlasen) genannt und sind ubiquitär in allen Domänen des Lebens zu finden. In der Zelle erfüllen PPlasen eine wichtige Rolle bei der Faltung und Regulation einer Vielzahl von Proteinen.

In dieser Arbeit konnte erstmals die endogene Expression und detaillierte Charakterisierung eines archaealen Parvulins gezeigt werden. *NmPin* aus dem marinen, chemolithoautotrophen Thaumarchaeon *Nitrosopumilus maritimus* ist eine kleine *single domain* PPlase vom Parvulintyp (sdPar), welche in einem Proteasegekoppelten Aktivitätsassay Isomeraseaktivität gegenüber einer Reihe von unphosphorylierten, peptidischen Substraten zeigte. Mit Hilfe von NMR-Titrationsexperimenten und Mutagenesestudien konnte das aktive Zentrum und einzelne für die Katalyse benötigte Reste (D42, S82) in der dreidimensionalen Struktur von *NmPin* lokalisiert werden. Eine detaillierte Untersuchung der Ligandenbindung zeigte zudem die Beteiligung eines Netzwerks von oberflächennahen, hydrophoben, verzweigten Aminosäureseitenketten bei der Fixierung des Liganden in der Prolinbindetasche.

Bei genauer Analyse der Proteinoberfläche von *NmPin* konnte eine positiv geladene, Lysin-reiche Fläche identifiziert werden, die laut *in vitro*-Sedimentationsstudien für die Bindung von *NmPin* an Lipidvesikel verantwortlich ist. Bereits der Austausch eines zentralen, innerhalb der Thaumarchaeota konservierten Lysins (K7) gegen ein Glutamat führte zu einem Verlust der Bindungsfähigkeit. In Kooperation mit der Universität Aberdeen konnten immunofluoreszenz- und transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von *NmPin* in *N. maritimus*-Zellen gemacht werden, welche die Bindung des Proteins von außen an die Zellmembran *in vivo* bestätigen. Die Ergebnisse lassen eine Lokalisation der PPlase in einem pseudo-periplasmatischen Raum zwischen der Zellmembran und dem *S-Layer* vermuten. Potentielle zelluläre Substrate für *NmPin* stellen in diesen Raum sekretierte Proteine oder Proteine des *S-Layers* dar.

Abstract: Studies of the prolyl isomerase NmPin from *Nitrosopumilus maritimus*

Peptidyl-prolyl-bonds (Xaa-Pro) are exceptional in peptides and proteins due to their ability to form stable *cis*-isomers in contrast to all other non-proline peptide bonds. Relative to their position in a protein *cis*-isomeric Xaa-Pro bonds have a strong impact on the three-dimensional structure and function of the protein. Enzymes which catalyse the rotation between *cis*- and *trans*-isomers are called peptidyl-prolyl-*cis/trans*-isomerases (PPlases) and are ubiquitously found in all domains of life. In the cell PPlases play a crucial role in protein folding and protein regulating processes.

This study is the first description of an endogenously expressed and in detail characterized archaeal PPlase. NmPin from the marine, chemolithoautotrophic thaumarchaeon *Nitrosopumilus maritimus* is a small parvulin-type single domain PPlase (sdPar) which showed isomerase activity against a subset of unphosphorylated peptidic substrates in a protease-coupled activity assay. By using NMR titration experiments and mutagenesis studies the active site as well as single residues essential for catalysis (D42, S82) were identified in the three-dimensional structure of NmPin. In addition a more detailed investigation of the ligand binding mechanism showed the participation of a network of surface exposed, hydrophobic, branched residue sidechains in ligand fixation inside the proline binding pocket.

A thorough topological analysis revealed a positively charged, lysine-rich patch on the protein surface which targets NmPin to lipid vesicles *in vitro*. The exchange of a single central lysine (K7), which is conserved in thaumarchaeotes, against a glutamate already leads to a loss of the binding ability. Immunofluorescence- and transmission electron microscopy of NmPin in *N. maritimus* cells confirms that the protein is attached to the outer cell membrane *in vivo*. The results provide a model where the PPlase is located in a pseudo-periplasmic space between the cell membrane and the S-Layer. Hence potential cellular substrates for NmPin are proteins secreted into this space or proteins of the S-Layer.

7 Anhang

7.1 Verwendete Primer

Konstrukt	Template	Interne Nomenklatur	Sequenz 5' → 3'	T _m [°C]
<i>NmPinK7E</i>	<i>NmPinWT</i>	2044F	GGGCCCTCAAACAAAATCGAATGTTACACATCC	74
		2045R	GGATGTGTGAACATTGATTTTGTGAGGGCCC	74
<i>NmPinC8A</i>	<i>NmPinWT</i>	2046F	GGGCCCTCAAACAAAATCAAAGCGTCACACATCC	75
		2047R	GGATGTGTGACGCTTGATTTTGTGAGGGCCC	75
<i>NmPinK34E</i>	<i>NmPinWT</i>	2048F	GGAGAAAAATTTGGAGAATTGGCAAAAGAAC	67
		2049R	GTTCTTTTGCCAATTCTCCAAATTTTCTCC	67
<i>NmPinD42A</i>	<i>NmPinWT</i>	2118F	ACTTTCCATTGCGTCAGGAAGTGCC	67
		2119R	TCTTTTGCCAATTTTCCAAATTTTTC	58
<i>NmPinD42C</i>	<i>NmPinWT</i>	2120F	ACTTTCCATTGCTCAGGAAGTGCC	66
		2121R	TCTTTTGCCAATTTTCCAAATTTTTC	58
<i>NmPinS82A</i>	<i>NmPinWT</i>	2122F	GCCAATAAAAGCGGAGTTCGGATATC	66
		2123R	TCAGATACCTCTCCAACCTG	56
<i>NmPinV61A</i>	<i>NmPinWT</i>	2126F	AGGCATGATGGCTAAGCCCTTTG	65
		2127R	TTTGTAATAATCCTAGATTTCCATTTTTTTGG	64
<i>NmPinV61T</i>	<i>NmPinWT</i>	2149F	AGGCATGATGACTAAGCCCTTTG	63
		2150R	TTTGTAATAATCCTAGATTTCCATTTTTTTTG	63
<i>NmPinE83Q</i>	<i>NmPinWT</i>	2171F	AATAAAATCACAGTTCCGGATATCATATTATCAAG	66
		2172R	GGCTCAGATACCTCTCCAAC	60
<i>NmPinE83R</i>	<i>NmPinWT</i>	2173F	AATAAAATCACGCTTCGGATATCATATTATCAAGAGA TTCGGATAAGG	75
		2174R	GGCTCAGATACCTCTCCAAC	63

7.2 Parameter für verwendete NMR-Spektren

Spektrum	NS	F1		F2		Quelle
		SW [ppm]	TD	SW [ppm]	TD	
¹ H- ¹⁵ N-SOFAST-HMQC (sfhmqcf3gpqh)	2	38,0000	512	15,0012	2048	(205)
¹ H- ¹³ C-HSQC (hsqcetgpsi)	4	90,0004	256	16,0824	2048	(206)
¹ H- ¹³ C-HSQC ohne ¹³ C-Entkopplung (hsqcetpsi)	40	44,0000	1024	16,0824	2048	(141)
¹ H- ¹³ C-HSQC <i>constant time</i> (hsqcctetgpsi)	128	38,0000	512	15,00012	1024	(142)

NS: Anzahl der Scans

SW: Spektralweite [ppm]

TD: Größe des FID

8 Literaturverzeichnis

1. Voet, D. (2003) *Lehrbuch der Biochemie*, John Wiley & Sons
2. Dobson, C. M., Šali, A., and Karplus, M. (1998) Protein Folding: A Perspective from Theory and Experiment. *Angewandte Chemie International Edition* **37**, 868–893
3. Bartlett, A. I., and Radford, S. E. (2009) An expanding arsenal of experimental methods yields an explosion of insights into protein folding mechanisms. *Nature structural & molecular biology* **16**, 582–588
4. Hartl, F. U., Bracher, A., and Hayer-Hartl, M. (2011) Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* **475**, 324–332
5. Wolynes, P. G., Onuchic, J. N., and Thirumalai, D. (1995) Navigating the folding routes. *Science (New York, N.Y.)* **267**, 1619–1620
6. Dill, K. A., and Chan, H. S. (1997) From Levinthal to pathways to funnels. *Nature structural biology* **4**, 10–19
7. Dinner, A. R., Sali, A., Smith, L. J., Dobson, C. M., and Karplus, M. (2000) Understanding protein folding via free-energy surfaces from theory and experiment. *Trends in biochemical sciences* **25**, 331–339
8. Eaton, W. A., Muñoz, V., Thompson, P. A., Henry, E. R., and Hofrichter, J. (1998) Kinetics and Dynamics of Loops, α -Helices, β -Hairpins, and Fast-Folding Proteins. *Acc. Chem. Res.* **31**, 745–753
9. Snow, C. D., Nguyen, H., Pande, V. S., and Gruebele, M. (2002) Absolute comparison of simulated and experimental protein-folding dynamics. *Nature* **420**, 102–106
10. Yang, W. Y., and Gruebele, M. (2003) Folding at the speed limit. *Nature* **423**, 193–197
11. Mayor, U., Guydosh, N. R., Johnson, C. M., Grossmann, J. G., Sato, S., Jas, G. S., Freund, S. M., Alonso, D. O., Daggett, V., and Fersht, A. R. (2003) The complete folding pathway of a protein from nanoseconds to microseconds. *Nature* **421**, 863–867
12. Grathwohl, C., and Wüthrich, K. (1981) Nmr studies of the rates of proline cis - trans isomerization in oligopeptides. *Biopolymers* **20**, 2623–2633
13. Schmid, F. X. (1993) Prolyl isomerase: enzymatic catalysis of slow protein-folding reactions. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **22**, 123–142
14. Brandts, J. F., Halvorson, H. R., and Brennan, M. (1975) Consideration of the Possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to cis-trans isomerism of proline residues. *Biochemistry* **14**, 4953–4963
15. Hurle, and Matthews, C. R. (1987) Proline isomerization and the slow folding reactions of the alpha subunit of tryptophan synthase from Escherichia coli. *Biochimica et biophysica acta* **913**, 179–184
16. Reimer, U., Scherer, G., Drewello, M., Kruber, S., Schutkowski, M., and Fischer, G. (1998) Side-chain effects on peptidyl-prolyl cis/trans isomerisation. *Journal of molecular biology* **279**, 449–460
17. Ganguly, H. K., Kaur, H., and Basu, G. (2013) Local control of cis-peptidyl-prolyl bonds mediated by CH...pi interactions: the Xaa-Pro-Tyr motif. *Biochemistry* **52**, 6348–6357
18. Zimmerman, S. S., and Scheraga, H. A. (1976) Stability of cis, trans, and nonplanar peptide groups. *Macromolecules* **9**, 408–416
19. Wedemeyer, W. J., Welker, E., and Scheraga, H. A. (2002) Proline cis-trans isomerization and protein folding. *Biochemistry* **41**, 14637–14644
20. Stewart, D. E., Sarkar, A., and Wampler, J. E. (1990) Occurrence and role of cis peptide bonds in protein structures. *Journal of molecular biology* **214**, 253–260

21. Pal, D., and Chakrabarti, P. (1999) Cis peptide bonds in proteins: residues involved, their conformations, interactions and locations. *Journal of molecular biology* **294**, 271–288
22. Wlodawer, A., La Svensson, Sjolín, L., and Gilliland, G. L. (1988) Structure of phosphate-free ribonuclease A refined at 1.26 Å. *Biochemistry* **27**, 2705–2717
23. PAULING, L., and COREY, R. B. (1953) Stable configurations of polypeptide chains. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **141**, 21–33
24. Steinberg, I. Z., Harrington, W. F., Berger, A., Sela, M., and Katchalski, E. (1960) The Configurational Changes of Poly-L-proline in Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 5263–5279
25. Pincus, M. R., Gerewitz, F., Wako, H., and Scheraga, H. A. (1983) Cis-trans isomerization of proline in the peptide (his 105-Val 124) of ribonuclease a containing the primary nucleation site. *J Protein Chem* **2**, 131–146
26. Kang, Y. K. (2002) Cis-Trans Isomerization and Puckering of Pseudoproline Dipeptides. *J. Phys. Chem. B* **106**, 2074–2082
27. Fanghänel, J., and Fischer, G. (2004) Insights into the catalytic mechanism of peptidyl prolyl cis/trans isomerases. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **9**, 3453–3478
28. Schmid, F. X., Mayr, L. M., Mücke, M., and Schönbrunner, E. R. (1993) Prolyl isomerases: role in protein folding. *Advances in protein chemistry* **44**, 25–66
29. Stein, R. L. (1993) Mechanism of enzymatic and nonenzymatic prolyl cis-trans isomerization. *Advances in protein chemistry* **44**, 1–24
30. Andreotti, A. H. (2003) Native state proline isomerization: an intrinsic molecular switch. *Biochemistry* **42**, 9515–9524
31. Lu, K. P., Finn, G., Lee, T. H., and Nicholson, L. K. (2007) Prolyl cis-trans isomerization as a molecular timer. *Nature chemical biology* **3**, 619–629
32. Pahlke, D., Leitner, D., Wiedemann, U., and Labudde, D. (2005) COPS--cis/trans peptide bond conformation prediction of amino acids on the basis of secondary structure information. *Bioinformatics (Oxford, England)* **21**, 685–686
33. Pahlke, D., Freund, C., Leitner, D., and Labudde, D. (2005) Statistically significant dependence of the Xaa-Pro peptide bond conformation on secondary structure and amino acid sequence. *BMC structural biology* **5**, 8
34. Lu, K. P., and Zhou, X. Z. (2007) The prolyl isomerase PIN1: a pivotal new twist in phosphorylation signalling and disease. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**, 904–916
35. Fischer, G., Bang, H., and Mech, C. (1984) Nachweis einer Enzymkatalyse für die cis-trans-Isomerisierung der Peptidbindung in prolinhaltigen Peptiden. *Biomedica biochimica acta* **43**, 1101–1111
36. Fischer, G., Wittmann-Liebold, B., Lang, K., Kiefhaber, T., and Schmid, F. X. (1989) Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature* **337**, 476–478
37. Takahashi, N., Hayano, T., and Suzuki, M. (1989) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature* **337**, 473–475
38. Schmidpeter, P. A. M., and Schmid, F. X. (2015) Prolyl isomerization and its catalysis in protein folding and protein function. *Journal of molecular biology* **427**, 1609–1631
39. Handschumacher, R. E., Harding, M. W., Rice, J., Drugge, R. J., and Speicher, D. W. (1984) Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science (New York, N.Y.)* **226**, 544–547

40. Siekierka, J. J., Hung, S. H., Poe, M., Lin, C. S., and Sigal, N. H. (1989) A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin. *Nature* **341**, 755–757
41. Harding, M. W., Galat, A., Uehling, D. E., and Schreiber, S. L. (1989) A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase. *Nature* **341**, 758–760
42. Rahfeld, J. U., Rücknagel, K. P., Schelbert, B., Ludwig, B., Hacker, J., Mann, K., and Fischer, G. (1994) Confirmation of the existence of a third family among peptidyl-prolyl cis/trans isomerases. Amino acid sequence and recombinant production of parvulin. *FEBS letters* **352**, 180–184
43. Rahfeld, J. U., Schierhorn, A., Mann, K., and Fischer, G. (1994) A novel peptidyl-prolyl cis/trans isomerase from *Escherichia coli*. *FEBS letters* **343**, 65–69
44. Leulliot, N., Vicentini, G., Jordens, J., Quevillon-Cheruel, S., Schiltz, M., Barford, D., van Tilbeurgh, H., and Goris, J. (2006) Crystal structure of the PP2A phosphatase activator: implications for its PP2A-specific PPlase activity. *Molecular cell* **23**, 413–424
45. Jordens, J., Janssens, V., Longin, S., Stevens, I., Martens, E., Bultynck, G., Engelborghs, Y., Lescrinier, E., Waelkens, E., Goris, J., and van Hoof, C. (2006) The protein phosphatase 2A phosphatase activator is a novel peptidyl-prolyl cis/trans-isomerase. *The Journal of biological chemistry* **281**, 6349–6357
46. van Hoof, C., Janssens, V., Baere, I. de, Winde, J. H. de, Winderickx, J., Dumortier, F., Thevelein, J. M., Merlevede, W., and Goris, J. (2000) The *Saccharomyces cerevisiae* homologue YPA1 of the mammalian phosphotyrosyl phosphatase activator of protein phosphatase 2A controls progression through the G1 phase of the yeast cell cycle. *Journal of molecular biology* **302**, 103–120
47. van Hoof, C., Martens, E., Longin, S., Jordens, J., Stevens, I., Janssens, V., and Goris, J. (2005) Specific interactions of PP2A and PP2A-like phosphatases with the yeast PTPA homologues, Ypa1 and Ypa2. *The Biochemical journal* **386**, 93–102
48. Goyal, A., and Simanis, V. (2012) Characterization of ypa1 and ypa2, the *Schizosaccharomyces pombe* orthologs of the peptidyl prolyl isomerases that activate PP2A, reveals a role for Ypa2p in the regulation of cytokinesis. *Genetics* **190**, 1235–1250
49. Landrieu, I., Wieruszeski, J.-M., Wintjens, R., Inzé, D., and Lippens, G. (2002) Solution structure of the single-domain prolyl cis/trans isomerase PIN1At from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of molecular biology* **320**, 321–332
50. Tossavainen, H., Permi, P., Purhonen, S. L., Sarvas, M., Kilpeläinen, I., and Seppala, R. (2006) NMR solution structure and characterization of substrate binding site of the PPlase domain of PrsA protein from *Bacillus subtilis*. *FEBS letters* **580**, 1822–1826
51. Li, Z., Li, H., Devasahayam, G., Gemmill, T., Chaturvedi, V., Hanes, S. D., and van Roey, P. (2005) The structure of the *Candida albicans* Ess1 prolyl isomerase reveals a well-ordered linker that restricts domain mobility. *Biochemistry* **44**, 6180–6189
52. Jaremko, Ł., Jaremko, M., Elfaki, I., Mueller, J. W., Ejchart, A., Bayer, P., and Zhukov, I. (2011) Structure and dynamics of the first archaeal parvulin reveal a new functionally important loop in parvulin-type prolyl isomerases. *The Journal of biological chemistry* **286**, 6554–6565
53. Bitto, E., and McKay, D. B. (2002) Crystallographic structure of SurA, a molecular chaperone that facilitates folding of outer membrane porins. *Structure (London, England : 1993)* **10**, 1489–1498
54. Kühlewein, A., Voll, G., Hernandez Alvarez, B., Kessler, H., Fischer, G., Rahfeld, J.-U., and Gemmecker, G. (2004) Solution structure of *Escherichia coli* Par10: The prototypic

- member of the Parvulin family of peptidyl-prolyl cis/trans isomerases. *Protein science : a publication of the Protein Society* **13**, 2378–2387
55. Weininger, U., Jakob, R. P., Kovermann, M., Balbach, J., and Schmid, F. X. (2010) The prolyl isomerase domain of PpiD from *Escherichia coli* shows a parvulin fold but is devoid of catalytic activity. *Protein science : a publication of the Protein Society* **19**, 6–18
 56. Ranganathan, R., Lu, K. P., Hunter, T., and Noel, J. P. (1997) Structural and functional analysis of the mitotic rotamase Pin1 suggests substrate recognition is phosphorylation dependent. *Cell* **89**, 875–886
 57. Bayer, E., Goettsch, S., Mueller, J. W., Griewel, B., Guiberman, E., Mayr, L. M., and Bayer, P. (2003) Structural analysis of the mitotic regulator hPin1 in solution: insights into domain architecture and substrate binding. *The Journal of biological chemistry* **278**, 26183–26193
 58. Sekerina, E., Rahfeld, J. U., Müller, J., Fanghänel, J., Rascher, C., Fischer, G., and Bayer, P. (2000) NMR solution structure of hPar14 reveals similarity to the peptidyl prolyl cis/trans isomerase domain of the mitotic regulator hPin1 but indicates a different functionality of the protein. *Journal of molecular biology* **301**, 1003–1017
 59. Terada, T., Shirouzu, M., Fukumori, Y., Fujimori, F., Ito, Y., Kigawa, T., Yokoyama, S., and Uchida, T. (2001) Solution structure of the human parvulin-like peptidyl prolyl cis/trans isomerase, hPar14. *Journal of molecular biology* **305**, 917–926
 60. Heikkinen, O., Seppala, R., Tossavainen, H., Heikkinen, S., Koskela, H., Permi, P., and Kilpeläinen, I. (2009) Solution structure of the parvulin-type PPIase domain of *Staphylococcus aureus* PrsA--implications for the catalytic mechanism of parvulins. *BMC structural biology* **9**, 17
 61. Sun, L., Wu, X., Peng, Y., Goh, J. Y., Liou, Y.-C., Lin, D., and Zhao, Y. (2012) Solution structural analysis of the single-domain parvulin TbPin1. *PloS one* **7**, e43017
 62. Yaffe, M. B., Schutkowski, M., Shen, M., Zhou, X. Z., Stukenberg, P. T., Rahfeld, J. U., Xu, J., Kuang, J., Kirschner, M. W., Fischer, G., Cantley, L. C., and Lu, K. P. (1997) Sequence-specific and phosphorylation-dependent proline isomerization: a potential mitotic regulatory mechanism. *Science (New York, N.Y.)* **278**, 1957–1960
 63. Wang, Y., Liu, C., Yang, D., Yu, H., and Liou, Y.-C. (2010) Pin1At encoding a peptidyl-prolyl cis/trans isomerase regulates flowering time in *Arabidopsis*. *Molecular cell* **37**, 112–122
 64. Xi, W., Gong, X., Yang, Q., Yu, H., and Liou, Y.-C. (2016) Pin1At regulates PIN1 polar localization and root gravitropism. *Nature communications* **7**, 10430
 65. Devasahayam, G., Chaturvedi, V., and Hanes, S. D. (2002) The Ess1 prolyl isomerase is required for growth and morphogenetic switching in *Candida albicans*. *Genetics* **160**, 37–48
 66. Hanes, S. D. (2014) The Ess1 prolyl isomerase: traffic cop of the RNA polymerase II transcription cycle. *Biochimica et biophysica acta* **1839**, 316–333
 67. Osmani, S. A., Pu, R. T., and Morris, N. R. (1988) Mitotic induction and maintenance by overexpression of a G2-specific gene that encodes a potential protein kinase. *Cell* **53**, 237–244
 68. Osmani, S. A., Engle, D. B., Doonan, J. H., and Morris, N. R. (1988) Spindle formation and chromatin condensation in cells blocked at interphase by mutation of a negative cell cycle control gene. *Cell* **52**, 241–251
 69. Osmani, A. H., McGuire, S. L., and Osmani, S. A. (1991) Parallel activation of the NIMA and p34cdc2 cell cycle-regulated protein kinases is required to initiate mitosis in *A. nidulans*. *Cell* **67**, 283–291

70. Lu, K. P., Hanes, S. D., and Hunter, T. (1996) A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis. *Nature* **380**, 544–547
71. Lu, K. P., Liou, Y. C., and Zhou, X. Z. (2002) Pinning down proline-directed phosphorylation signaling. *Trends in cell biology* **12**, 164–172
72. Blume-Jensen, P., and Hunter, T. (2001) Oncogenic kinase signalling. *Nature* **411**, 355–365
73. Nigg, E. A. (2001) Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2**, 21–32
74. Lee, M.-S., and Tsai, L.-H. (2003) Cdk5: one of the links between senile plaques and neurofibrillary tangles? *Journal of Alzheimer's disease : JAD* **5**, 127–137
75. Lee, T. H., Pastorino, L., and Lu, K. P. (2011) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase Pin1 in ageing, cancer and Alzheimer disease. *Expert reviews in molecular medicine* **13**, e21
76. Lu, K. P. (2004) Pinning down cell signaling, cancer and Alzheimer's disease. *Trends in biochemical sciences* **29**, 200–209
77. Lu, K. P., Liou, Y.-C., and Vincent, I. (2003) Proline-directed phosphorylation and isomerization in mitotic regulation and in Alzheimer's Disease. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **25**, 174–181
78. Pastorino, L., Sun, A., Lu, P.-J., Zhou, X. Z., Balastik, M., Finn, G., Wulf, G., Lim, J., Li, S.-H., Li, X., Xia, W., Nicholson, L. K., and Lu, K. P. (2006) The prolyl isomerase Pin1 regulates amyloid precursor protein processing and amyloid-beta production. *Nature* **440**, 528–534
79. Uchida, T., Fujimori, F., Tradler, T., Fischer, G., and Rahfeld, J. U. (1999) Identification and characterization of a 14 kDa human protein as a novel parvulin-like peptidyl prolyl cis/trans isomerase. *FEBS letters* **446**, 278–282
80. Surmacz, T. A., Bayer, E., Rahfeld, J. U., Fischer, G., and Bayer, P. (2002) The N-terminal basic domain of human parvulin hPar14 is responsible for the entry to the nucleus and high-affinity DNA-binding. *Journal of molecular biology* **321**, 235–247
81. Fujiyama, S., Yanagida, M., Hayano, T., Miura, Y., Isobe, T., Fujimori, F., Uchida, T., and Takahashi, N. (2002) Isolation and proteomic characterization of human Parvulin-associating preribosomal ribonucleoprotein complexes. *The Journal of biological chemistry* **277**, 23773–23780
82. Reimer, T., Weiwad, M., Schierhorn, A., Ruecknagel, P.-K., Rahfeld, J.-U., Bayer, P., and Fischer, G. (2003) Phosphorylation of the N-terminal domain regulates subcellular localization and DNA binding properties of the peptidyl-prolyl cis/trans isomerase hPar14. *Journal of molecular biology* **330**, 955–966
83. Mueller, J. W., Kessler, D., Neumann, D., Stratmann, T., Papatheodorou, P., Hartmann-Fatu, C., and Bayer, P. (2006) Characterization of novel elongated Parvulin isoforms that are ubiquitously expressed in human tissues and originate from alternative transcription initiation. *BMC molecular biology* **7**, 9
84. Kessler, D., Papatheodorou, P., Stratmann, T., Dian, E. A., Hartmann-Fatu, C., Rassow, J., Bayer, P., and Mueller, J. W. (2007) The DNA binding parvulin Par17 is targeted to the mitochondrial matrix by a recently evolved prepeptide uniquely present in Hominidae. *BMC biology* **5**, 37
85. Mueller, J. W., Link, N. M., Matena, A., Hoppstock, L., Rüppel, A., Bayer, P., and Blankenfeldt, W. (2011) Crystallographic proof for an extended hydrogen-bonding network in small prolyl isomerases. *Journal of the American Chemical Society* **133**, 20096–20099

86. Saningong, A. D., and Bayer, P. (2015) Human DNA-binding peptidyl-prolyl cis/trans isomerase Par14 is cell cycle dependently expressed and associates with chromatin in vivo. *BMC biochemistry* **16**, 4
87. Scholz, C., Rahfeld, J., Fischer, G., and Schmid, F. X. (1997) Catalysis of protein folding by parvulin. *Journal of molecular biology* **273**, 752–762
88. Stymest, K. H., and Klappa, P. (2008) The periplasmic peptidyl prolyl cis-trans isomerases PpiD and SurA have partially overlapping substrate specificities. *The FEBS journal* **275**, 3470–3479
89. Bitto, E., and McKay, D. B. (2003) The periplasmic molecular chaperone protein SurA binds a peptide motif that is characteristic of integral outer membrane proteins. *The Journal of biological chemistry* **278**, 49316–49322
90. Hyyryläinen, H.-L., Marciniak, B. C., Dahncke, K., Pietiäinen, M., Courtin, P., Vitikainen, M., Seppala, R., Otto, A., Becher, D., Chapot-Chartier, M.-P., Kuipers, O. P., and Kontinen, V. P. (2010) Penicillin-binding protein folding is dependent on the PrsA peptidyl-prolyl cis-trans isomerase in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology* **77**, 108–127
91. Jacobs, M., Andersen, J. B., Kontinen, V., and Sarvas, M. (1993) *Bacillus subtilis* PrsA is required in vivo as an extracytoplasmic chaperone for secretion of active enzymes synthesized either with or without pro-sequences. *Molecular microbiology* **8**, 957–966
92. Jakob, R. P., Koch, J. R., Burmann, B. M., Schmidpeter, P. A. M., Hunkeler, M., Hiller, S., Schmid, F. X., and Maier, T. (2015) Dimeric Structure of the Bacterial Extracellular Foldase PrsA. *The Journal of biological chemistry* **290**, 3278–3292
93. Vitikainen, M., Lappalainen, I., Seppala, R., Antelmann, H., Boer, H., Taira, S., Savilahti, H., Hecker, M., Vihinen, M., Sarvas, M., and Kontinen, V. P. (2004) Structure-function analysis of PrsA reveals roles for the parvulin-like and flanking N- and C-terminal domains in protein folding and secretion in *Bacillus subtilis*. *The Journal of biological chemistry* **279**, 19302–19314
94. Fujiyama-Nakamura, S., Yoshikawa, H., Homma, K., Hayano, T., Tsujimura-Takahashi, T., Izumikawa, K., Ishikawa, H., Miyazawa, N., Yanagida, M., Miura, Y., Shinkawa, T., Yamauchi, Y., Isobe, T., and Takahashi, N. (2009) Parvulin (Par14), a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, is a novel rRNA processing factor that evolved in the metazoan lineage. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **8**, 1552–1565
95. Zhang, J., Nakatsu, Y., Shinjo, T., Guo, Y., Sakoda, H., Yamamotoya, T., Otani, Y., Okubo, H., Kushiya, A., Fujishiro, M., Fukushima, T., Tsuchiya, Y., Kamata, H., Iwashita, M., Nishimura, F., Katagiri, H., Takahashi, S.-i., Kurihara, H., Uchida, T., and Asano, T. (2013) Par14 protein associates with insulin receptor substrate 1 (IRS-1), thereby enhancing insulin-induced IRS-1 phosphorylation and metabolic actions. *The Journal of biological chemistry* **288**, 20692–20701
96. Burgardt, N. I., Schmidt, A., Manns, A., Schutkowski, A., Jahreis, G., Lin, Y.-J., Schulze, B., Masch, A., Lucke, C., and Weiwad, M. (2015) Parvulin 17-catalyzed Tubulin Polymerization Is Regulated by Calmodulin in a Calcium-dependent Manner. *The Journal of biological chemistry* **290**, 16708–16722
97. Tormo, A., Almiron, M., and Kolter, R. (1990) surA, an *Escherichia coli* gene essential for survival in stationary phase. *Journal of bacteriology* **172**, 4339–4347
98. Rouvière, P. E., and Gross, C. A. (1996) SurA, a periplasmic protein with peptidyl-prolyl isomerase activity, participates in the assembly of outer membrane porins. *Genes & development* **10**, 3170–3182

99. Behrens, S., Maier, R., Cock, H. de, Schmid, F. X., and Gross, C. A. (2001) The SurA periplasmic PPIase lacking its parvulin domains functions in vivo and has chaperone activity. *The EMBO journal* **20**, 285–294
100. Geitner, A.-J., Varga, E., Wehmer, M., and Schmid, F. X. (2013) Generation of a highly active folding enzyme by combining a parvulin-type prolyl isomerase from SurA with an unrelated chaperone domain. *Journal of molecular biology* **425**, 4089–4098
101. Soltes, G. R., Schwalm, J., Ricci, D. P., and Silhavy, T. J. (2016) The Activity of Escherichia coli Chaperone SurA Is Regulated by Conformational Changes Involving a Parvulin Domain. *Journal of bacteriology* **198**, 921–929
102. Dartigalongue, C., and Raina, S. (1998) A new heat-shock gene, ppiD, encodes a peptidyl-prolyl isomerase required for folding of outer membrane proteins in Escherichia coli. *The EMBO journal* **17**, 3968–3980
103. Matern, Y., Barion, B., and Behrens-Kneip, S. (2010) PpiD is a player in the network of periplasmic chaperones in Escherichia coli. *BMC microbiology* **10**, 251
104. Wahlström, E., Vitikainen, M., Kontinen, V. P., and Sarvas, M. (2003) The extracytoplasmic folding factor PrsA is required for protein secretion only in the presence of the cell wall in Bacillus subtilis. *Microbiology (Reading, England)* **149**, 569–577
105. Vitikainen, M., Pummi, T., Airaksinen, U., Wahlstrom, E., Wu, H., Sarvas, M., and Kontinen, V. P. (2001) Quantitation of the capacity of the secretion apparatus and requirement for PrsA in growth and secretion of alpha-amylase in Bacillus subtilis. *Journal of bacteriology* **183**, 1881–1890
106. Alonzo, F. 3., Xayarath, B., Whisstock, J. C., and Freitag, N. E. (2011) Functional analysis of the Listeria monocytogenes secretion chaperone PrsA2 and its multiple contributions to bacterial virulence. *Molecular microbiology* **80**, 1530–1548
107. Hallam, S. J., Konstantinidis, K. T., Putnam, N., Schleper, C., Watanabe, Y.-i., Sugahara, J., Preston, C., La Torre, J. de, Richardson, P. M., and DeLong, E. F. (2006) Genomic analysis of the uncultivated marine crenarchaeote Cenarchaeum symbiosum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 18296–18301
108. Preston, C. M., Wu, K. Y., Molinski, T. F., and DeLong, E. F. (1996) A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: Cenarchaeum symbiosum gen. nov., sp. nov. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 6241–6246
109. Könneke, M., Bernhard, A. E., de la Torre, José R, Walker, C. B., Waterbury, J. B., and Stahl, D. A. (2005) Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* **437**, 543–546
110. Walker, C. B., de la Torre, J R, Klotz, M. G., Urakawa, H., Pinel, N., Arp, D. J., Brochier-Armanet, C., Chain, P S G, Chan, P. P., Gollabgir, A., Hemp, J., Hügler, M., Karr, E. A., Könneke, M., Shin, M., Lawton, T. J., Lowe, T., Martens-Habbena, W., Sayavedra-Soto, L. A., Lang, D., Sievert, S. M., Rosenzweig, A. C., Manning, G., and Stahl, D. A. (2010) Nitrosopumilus maritimus genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 8818–8823
111. Karner, M. B., DeLong, E. F., and Karl, D. M. (2001) Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature* **409**, 507–510
112. Urakawa, H., Martens-Habbena, W., and Stahl, D. A. (2010) High abundance of ammonia-oxidizing Archaea in coastal waters, determined using a modified DNA extraction method. *Applied and environmental microbiology* **76**, 2129–2135

113. Martens-Habbena, W., Berube, P. M., Urakawa, H., de la Torre, José R, and Stahl, D. A. (2009) Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying Archaea and Bacteria. *Nature* **461**, 976–979
114. Martens-Habbena, W., and Stahl, D. A. (2011) Nitrogen metabolism and kinetics of ammonia-oxidizing archaea. *Methods in enzymology* **496**, 465–487
115. Stahl, D. A., and de la Torre, José R (2012) Physiology and diversity of ammonia-oxidizing archaea. *Annual review of microbiology* **66**, 83–101
116. Ward, B. B., Arp, D. J., and Klotz, M. G. (2011) *Nitrification*, ASM Press, Washington, DC
117. Brochier-Armanet, C., Boussau, B., Gribaldo, S., and Forterre, P. (2008) Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nature reviews. Microbiology* **6**, 245–252
118. Lederer, C., Heider, D., van den Boom, Johannes, Hoffmann, D., Mueller, J. W., and Bayer, P. (2011) Single-domain parvulins constitute a specific marker for recently proposed deep-branching archaeal subgroups. *Evolutionary bioinformatics online* **7**, 135–148
119. Skinner, S. P., Goult, B. T., Fogh, R. H., Boucher, W., Stevens, T. J., Laue, E. D., and Vuister, G. W. (2015) Structure calculation, refinement and validation using CcpNmr Analysis. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **71**, 154–161
120. Vranken, W. F., Boucher, W., Stevens, T. J., Fogh, R. H., Pajon, A., Llinas, M., Ulrich, E. L., Markley, J. L., Ionides, J., and Laue, E. D. (2005) The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline. *Proteins* **59**, 687–696
121. Li, Y.-X., Shao, Y.-H., and Deng, N.-Y. (2011) Improved prediction of palmitoylation sites using PWMs and SVM. *Protein and peptide letters* **18**, 186–193
122. Yu, N. Y., Laird, M. R., Spencer, C., and Brinkman, F. S. L. (2011) PSORTdb--an expanded, auto-updated, user-friendly protein subcellular localization database for Bacteria and Archaea. *Nucleic acids research* **39**, D241-4
123. Krieger, E., Koraimann, G., and Vriend, G. (2002) Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA--a self-parameterizing force field. *Proteins* **47**, 393–402
124. Konagurthu, A. S., Whisstock, J. C., Stuckey, P. J., and Lesk, A. M. (2006) MUSTANG: a multiple structural alignment algorithm. *Proteins* **64**, 559–574
125. Krieger, E., Nielsen, J. E., Spronk, Chris A E M, and Vriend, G. (2006) Fast empirical pKa prediction by Ewald summation. *Journal of molecular graphics & modelling* **25**, 481–486
126. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685
127. Shevchenko, A., Jensen, O. N., Podtelejnikov, A. V., Sagliocco, F., Wilm, M., Vorm, O., Mortensen, P., Boucherie, H., and Mann, M. (1996) Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 14440–14445
128. Gharahdaghi, F., Weinberg, C. R., Meagher, D. A., Imai, B. S., and Mische, S. M. (1999) Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis* **20**, 601–605

129. Yan, J., Wen, W., Xu, W., Long, J.-F., Adams, M. E., Froehner, S. C., and Zhang, M. (2005) Structure of the split PH domain and distinct lipid-binding properties of the PH-PDZ supramodule of alpha-syntrophin. *The EMBO journal* **24**, 3985–3995
130. Krojer, T., Sawa, J., Schäfer, E., Saibil, H. R., Ehrmann, M., and Clausen, T. (2008) Structural basis for the regulated protease and chaperone function of DegP. *Nature* **453**, 885–890
131. Riener, C. K., Kada, G., and Gruber, H. J. (2002) Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Analytical and bioanalytical chemistry* **373**, 266–276
132. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248–254
133. Kofron, J. L., Kuzmic, P., Kishore, V., Colón-Bonilla, E., and Rich, D. H. (1991) Determination of kinetic constants for peptidyl prolyl cis-trans isomerases by an improved spectrophotometric assay. *Biochemistry* **30**, 6127–6134
134. Lin, L. N., and Brandts, J. F. (1984) Involvement of prolines-114 and -117 in the slow refolding phase of ribonuclease A as determined by isomer-specific proteolysis. *Biochemistry* **23**, 5713–5723
135. Lin, L. N., and Brandts, J. F. (1985) Isomer-specific proteolysis of model substrates: influence that the location of the proline residue exerts on cis/trans specificity. *Biochemistry* **24**, 6533–6538
136. Ayed, A., Mulder, F. A., Yi, G. S., Lu, Y., Kay, L. E., and Arrowsmith, C. H. (2001) Latent and active p53 are identical in conformation. *Nature structural biology* **8**, 756–760
137. Trent, J. D., Kagawa, H. K., Yaoi, T., Olle, E., and Zaluzec, N. J. (1997) Chaperonin filaments: the archaeal cytoskeleton? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 5383–5388
138. Schmidpeter, Philipp A M, Jahreis, G., Geitner, A.-J., and Schmid, F. X. (2011) Prolyl isomerases show low sequence specificity toward the residue following the proline. *Biochemistry* **50**, 4796–4803
139. Zoldak, G., Aumuller, T., Lucke, C., Hritz, J., Oostenbrink, C., Fischer, G., and Schmid, F. X. (2009) A library of fluorescent peptides for exploring the substrate specificities of prolyl isomerases. *Biochemistry* **48**, 10423–10436
140. Bailey, M. L., Shilton, B. H., Brandl, C. J., and Litchfield, D. W. (2008) The dual histidine motif in the active site of Pin1 has a structural rather than catalytic role. *Biochemistry* **47**, 11481–11489
141. Neri, D., Szyperski, T., Otting, G., Senn, H., and Wuthrich, K. (1989) Stereospecific nuclear magnetic resonance assignments of the methyl groups of valine and leucine in the DNA-binding domain of the 434 repressor by biosynthetically directed fractional ¹³C labeling. *Biochemistry* **28**, 7510–7516
142. Tugarinov, V., and Kay, L. E. (2004) Stereospecific NMR assignments of prochiral methyls, rotameric states and dynamics of valine residues in malate synthase G. *Journal of the American Chemical Society* **126**, 9827–9836
143. Schouten, S., Hopmans, E. C., Baas, M., Boumann, H., Standfest, S., Könneke, M., Stahl, D. A., and Sinninghe Damsté, Jaap S (2008) Intact membrane lipids of "Candidatus Nitrosopumilus maritimus," a cultivated representative of the cosmopolitan mesophilic group I Crenarchaeota. *Applied and environmental microbiology* **74**, 2433–2440

144. Pitcher, A., Hopmans, E. C., Mosier, A. C., Park, S.-J., Rhee, S.-K., Francis, C. A., Schouten, S., and Damsté, Jaap S Sinninghe (2011) Core and intact polar glycerol dibiphytanyl glycerol tetraether lipids of ammonia-oxidizing archaea enriched from marine and estuarine sediments. *Applied and environmental microbiology* **77**, 3468–3477
145. Elling, F. J., Könneke, M., Lipp, J. S., Becker, K. W., Gagen, E. J., and Hinrichs, K.-U. (2014) Effects of growth phase on the membrane lipid composition of the thaumarchaeon *Nitrosopumilus maritimus* and their implications for archaeal lipid distributions in the marine environment. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **141**, 579–597
146. de la Torre, José R, Walker, C. B., Ingalls, A. E., Könneke, M., and Stahl, D. A. (2008) Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol. *Environmental microbiology* **10**, 810–818
147. Kennelly, P. J. (2014) Protein Ser/Thr/Tyr phosphorylation in the Archaea. *The Journal of biological chemistry* **289**, 9480–9487
148. Lu, P. J., Zhou, X. Z., Shen, M., and Lu, K. P. (1999) Function of WW domains as phosphoserine- or phosphothreonine-binding modules. *Science (New York, N.Y.)* **283**, 1325–1328
149. Verdecia, M. A., Bowman, M. E., Lu, K. P., Hunter, T., and Noel, J. P. (2000) Structural basis for phosphoserine-proline recognition by group IV WW domains. *Nature structural biology* **7**, 639–643
150. Wintjens, R., Wieruszeski, J. M., Drobecq, H., Rousselot-Pailley, P., Buée, L., Lippens, G., and Landrieu, I. (2001) 1H NMR study on the binding of Pin1 Trp-Trp domain with phosphothreonine peptides. *The Journal of biological chemistry* **276**, 25150–25156
151. Wang, X., Mahoney, B. J., Zhang, M., Zintsmaster, J. S., and Peng, J. W. (2015) Negative Regulation of Peptidyl-Prolyl Isomerase Activity by Interdomain Contact in Human Pin1. *Structure (London, England : 1993)* **23**, 2224–2233
152. Peng, J. W. (2015) Investigating Dynamic Interdomain Allostery in Pin1. *Biophysical reviews* **7**, 239–249
153. Yao, J. L., Kops, O., Lu, P. J., and Lu, K. P. (2001) Functional conservation of phosphorylation-specific prolyl isomerases in plants. *The Journal of biological chemistry* **276**, 13517–13523
154. Chen, C.-H., Li, W., Sultana, R., You, M.-H., Kondo, A., Shahpasand, K., Kim, B. M., Luo, M.-L., Nechama, M., Lin, Y.-M., Yao, Y., Lee, T. H., Zhou, X. Z., Swomley, A. M., Allan Butterfield, D., Zhang, Y., and Lu, K. P. (2015) Pin1 cysteine-113 oxidation inhibits its catalytic activity and cellular function in Alzheimer's disease. *Neurobiology of disease* **76**, 13–23
155. Innes, B. T., Sowole, M. A., Gyenis, L., Dubinsky, M., Konermann, L., Litchfield, D. W., Brandl, C. J., and Shilton, B. H. (2015) Peroxide-mediated oxidation and inhibition of the peptidyl-prolyl isomerase Pin1. *Biochimica et biophysica acta* **1852**, 905–912
156. Kelly, S., Wickstead, B., and Gull, K. (2011) Archaeal phylogenomics provides evidence in support of a methanogenic origin of the Archaea and a thaumarchaeal origin for the eukaryotes. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* **278**, 1009–1018
157. Guy, L., and Ettema, T. J. G. (2011) The archaeal 'TACK' superphylum and the origin of eukaryotes. *Trends in microbiology* **19**, 580–587
158. Williams, T. A., Foster, P. G., Cox, C. J., and Embley, T. M. (2013) An archaeal origin of eukaryotes supports only two primary domains of life. *Nature* **504**, 231–236
159. Raymann, K., Brochier-Armanet, C., and Gribaldo, S. (2015) The two-domain tree of life is linked to a new root for the Archaea. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**, 6670–6675

160. Cox, C. J., Foster, P. G., Hirt, R. P., Harris, S. R., and Embley, T. M. (2008) The archaeobacterial origin of eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 20356–20361
161. Koonin, E. V. (2015) Archaeal ancestors of eukaryotes: not so elusive any more. *BMC biology* **13**, 84
162. Poole, A. M., and Neumann, N. (2011) Reconciling an archaeal origin of eukaryotes with engulfment: a biologically plausible update of the Eocyte hypothesis. *Research in microbiology* **162**, 71–76
163. Woese, C. R., Kandler, O., and Wheelis, M. L. (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 4576–4579
164. Lake, J. A., Henderson, E., Oakes, M., and Clark, M. W. (1984) Eocytes: a new ribosome structure indicates a kingdom with a close relationship to eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**, 3786–3790
165. Spang, A., Saw, J. H., Jørgensen, S. L., Zaremba-Niedzwiedzka, K., Martijn, J., Lind, A. E., van Eijk, R., Schleper, C., Guy, L., and Ettema, T. J. G. (2015) Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Nature* **521**, 173–179
166. Ladani, S. T., Souffrant, M. G., Barman, A., and Hamelberg, D. (2015) Computational perspective and evaluation of plausible catalytic mechanisms of peptidyl-prolyl cis-trans isomerases. *Biochimica et biophysica acta* **1850**, 1994–2004
167. Drakenberg, T. (1972) The barrier to internal rotation in amides. VI. Acetamide. solvent dependent entropy of activation. *Tetrahedron Letters* **13**, 1743–1746
168. Keller, M., Sager, C., Dumy, P., Schutkowski, M., Fischer, G. S., and Mutter, M. (1998) Enhancing the Proline Effect: Pseudo-Prolines for Tailoring Cis / Trans Isomerization. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 2714–2720
169. Eberhardt, E. S., Loh, S. N., Hinck, A. P., and Raines, R. T. (1992) Solvent Effects on the Energetics of Prolyl Peptide Bond Isomerization. *Journal of the American Chemical Society* **114**, 5437–5439
170. Ikura, T., Kinoshita, K., and Ito, N. (2008) A cavity with an appropriate size is the basis of the PPLase activity. *Protein engineering, design & selection : PEDS* **21**, 83–89
171. Ke, H., Mayrose, D., and Cao, W. (1993) Crystal structure of cyclophilin A complexed with substrate Ala-Pro suggests a solvent-assisted mechanism of cis-trans isomerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 3324–3328
172. Barman, A., Smitherman, C., Souffrant, M., Gadda, G., and Hamelberg, D. (2016) Conserved Hydration Sites in Pin1 Reveal a Distinctive Water Recognition Motif in Proteins. *Journal of chemical information and modeling* **56**, 139–147
173. Barman, A., and Hamelberg, D. (2014) Cysteine-mediated dynamic hydrogen-bonding network in the active site of Pin1. *Biochemistry* **53**, 3839–3850
174. Wang, J., Tochio, N., Kawasaki, R., Tamari, Y., Xu, N., Uewaki, J.-I., Utsunomiya-Tate, N., and Tate, S.-I. (2015) Allosteric Breakage of the Hydrogen Bond within the Dual-Histidine Motif in the Active Site of Human Pin1 PPLase. *Biochemistry* **54**, 5242–5253
175. Xu, N., Tochio, N., Wang, J., Tamari, Y., Uewaki, J.-I., Utsunomiya-Tate, N., Igarashi, K., Shiraki, T., Kobayashi, N., and Tate, S.-I. (2014) The C113D mutation in human Pin1 causes allosteric structural changes in the phosphate binding pocket of the PPLase domain through the tug of war in the dual-histidine motif. *Biochemistry* **53**, 5568–5578

176. Campas, O., and Mahadevan, L. (2009) Shape and dynamics of tip-growing cells. *Current biology : CB* **19**, 2102–2107
177. Furchtgott, L., Wingreen, N. S., and Huang, K. C. (2011) Mechanisms for maintaining cell shape in rod-shaped Gram-negative bacteria. *Molecular microbiology* **81**, 340–353
178. HOUWINK, A. L. (1956) Flagella, gas vacuoles and cell-wall structure in *Halobacterium halobium*; an electron microscope study. *Journal of general microbiology* **15**, 146–150
179. Kandler, O., and König, H. (1978) Chemical composition of the peptidoglycan-free cell walls of methanogenic bacteria. *Archives of microbiology* **118**, 141–152
180. Albers, S.-V., and Meyer, B. H. (2011) The archaeal cell envelope. *Nature reviews. Microbiology* **9**, 414–426
181. Maloney, P. C., Kashket, E. R., and Wilson, T. H. (1974) A protonmotive force drives ATP synthesis in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **71**, 3896–3900
182. Ades, S. E. (2008) Regulation by destruction: design of the sigmaE envelope stress response. *Current opinion in microbiology* **11**, 535–540
183. Alba, B. M., and Gross, C. A. (2004) Regulation of the *Escherichia coli* sigma-dependent envelope stress response. *Molecular microbiology* **52**, 613–619
184. Jain, S., Caforio, A., and Driessen, A. J. M. (2014) Biosynthesis of archaeal membrane ether lipids. *Frontiers in microbiology* **5**, 641
185. Koga, Y., and Morii, H. (2007) Biosynthesis of ether-type polar lipids in archaea and evolutionary considerations. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **71**, 97–120
186. Damste, J. S. S., Rijpstra, W. I. C., Hopmans, E. C., Jung, M.-Y., Kim, J.-G., Rhee, S.-K., Stieglmeier, M., and Schleper, C. (2012) Intact polar and core glycerol dibiphytanyl glycerol tetraether lipids of group I.1a and I.1b thaumarchaeota in soil. *Applied and environmental microbiology* **78**, 6866–6874
187. Damste, J. S. S., Schouten, S., Hopmans, E. C., van Duin, Adri C T, and Geenevasen, J. A. J. (2002) Crenarchaeol: the characteristic core glycerol dibiphytanyl glycerol tetraether membrane lipid of cosmopolitan pelagic crenarchaeota. *Journal of lipid research* **43**, 1641–1651
188. Mulgrew-Nesbitt, A., Diraviyam, K., Wang, J., Singh, S., Murray, P., Li, Z., Rogers, L., Mirkovic, N., and Murray, D. (2006) The role of electrostatics in protein-membrane interactions. *Biochimica et biophysica acta* **1761**, 812–826
189. Honig, B., and Nicholls, A. (1995) Classical electrostatics in biology and chemistry. *Science (New York, N.Y.)* **268**, 1144–1149
190. Bolhuis, A. (2004) The archaeal Sec-dependent protein translocation pathway. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **359**, 919–927
191. Albers, S.-V., Szabo, Z., and Driessen, A. J. M. (2006) Protein secretion in the Archaea: multiple paths towards a unique cell surface. *Nature reviews. Microbiology* **4**, 537–547
192. Ellen, A. F., Zolghadr, B., Driessen, A. M. J., and Albers, S.-V. (2010) Shaping the archaeal cell envelope. *Archaea (Vancouver, B.C.)* **2010**, 608243
193. Pohlschroder, M., Gimenez, M. I., and Jarrell, K. F. (2005) Protein transport in Archaea: Sec and twin arginine translocation pathways. *Current opinion in microbiology* **8**, 713–719

194. Messner, P., Pum, D., Sára, M., Stetter, K. O., and Sleytr, U. B. (1986) Ultrastructure of the cell envelope of the archaebacteria *Thermoproteus tenax* and *Thermoproteus neutrophilus*. *Journal of bacteriology* **166**, 1046–1054
195. Baumeister, W., and Lembecke, G. (1992) Structural features of archaebacterial cell envelopes. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **24**, 567–575
196. Boddey, J. A., O'Neill, M. T., Lopaticki, S., Carvalho, T. G., Hodder, A. N., Nebl, T., Wawra, S., van West, P., Ebrahimzadeh, Z., Richard, D., Flemming, S., Spielmann, T., Przyborski, J., Babon, J. J., and Cowman, A. F. (2016) Export of malaria proteins requires co-translational processing of the PEXEL motif independent of phosphatidylinositol-3-phosphate binding. *Nature communications* **7**, 10470
197. Ricci, D. P., Schwalm, J., Gonzales-Cope, M., and Silhavy, T. J. (2013) The activity and specificity of the outer membrane protein chaperone SurA are modulated by a proline isomerase domain. *mBio* **4**
198. Hennecke, G., Nolte, J., Volkmer-Engert, R., Schneider-Mergener, J., and Behrens, S. (2005) The periplasmic chaperone SurA exploits two features characteristic of integral outer membrane proteins for selective substrate recognition. *The Journal of biological chemistry* **280**, 23540–23548
199. Saleh, M., Song, C., Nasserulla, S., and Leduc, L. G. (2010) Indicators from archaeal secretomes. *Microbiological research* **165**, 1–10
200. Maruyama, T., Suzuki, R., and Furutani, M. (2004) Archaeal peptidyl prolyl cis-trans isomerases (PPIases) update 2004. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **9**, 1680–1720
201. Peters, J., Nitsch, M., Kühlmorgen, B., Golbik, R., Lupas, A., Kellermann, J., Engelhardt, H., Pfander, J. P., Müller, S., and Goldie, K. (1995) Tetrabrachion: a filamentous archaebacterial surface protein assembly of unusual structure and extreme stability. *Journal of molecular biology* **245**, 385–401
202. Peters, J., Baumeister, W., and Lupas, A. (1996) Hyperthermostable surface layer protein tetrabrachion from the archaebacterium *Staphylothermus marinus*: evidence for the presence of a right-handed coiled coil derived from the primary structure. *Journal of molecular biology* **257**, 1031–1041
203. Merz, A. J., So, M., and Sheetz, M. P. (2000) Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature* **407**, 98–102
204. Thomas, N. A., Bardy, S. L., and Jarrell, K. F. (2001) The archaeal flagellum: a different kind of prokaryotic motility structure. *FEMS microbiology reviews* **25**, 147–174
205. Schanda, P., and Brutscher, B. (2006) Hadamard frequency-encoded SOFAST-HMQC for ultrafast two-dimensional protein NMR. *Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif. : 1997)* **178**, 334–339
206. Palmer, A. G. 3. (1993) Dynamic properties of proteins from NMR spectroscopy. *Current opinion in biotechnology* **4**, 385–391

9 Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei Prof. Dr. Peter Bayer für die gesamte Zeit bedanken, die ich in seiner Arbeitsgruppe verbringen durfte. Vielen Dank, Peter, für die Vergabe dieses Projekts, für deine wissenschaftliche Unterstützung, für deine Begeisterung für die Strukturbiochemie und für deine herzliche Art.

Herzlich danken möchte ich Dr. Martin Könneke für die Bereitstellung der *N. maritimus*-Kultur und für jegliche Tipps und Tricks rund um Archaeen.

Danke an Dr. Anja Matena, Dr. Christine Beuck und Edisa Rehic für allerlei Hilfestellungen am NMR. Anja danke ich für die bestmögliche NMR-Einführung inklusive perfekt gezeichneter Anleitung für Analphabeten, Christine für das Herbeizaubern von neuen Pulsprogrammen und Edisa für hervorragenden technischen Support bei CCPN. Allen dreien danke ich obendrein für ihre große Hilfsbereitschaft.

Vielen Dank an Dr. Franzi Trusch für die Versorgung mit tollen Mikroskopieaufnahmen (in Rekordzeit) und für die wissenschaftliche Beratung (1. links von mir und 2. aus Aberdeen).

Dr. Julia Herfurth und Dr. André Matena danke ich ganz herzlich für die unzähligen kleinen, aber feinen, Tipps und Tricks innerhalb und außerhalb des Labors, am besten in Verbindung mit einer/zwei Tasse/n Kaffee oder alternativ Bier.

Bei Dr. Daniel Grum und Dr. Johannes van den Boom möchte ich mich für die Einführung in verschiedene spektroskopische Methoden und die anschließenden, für mich sehr lehrreichen, Diskussionen bedanken.

Meiner (neuen) Sitznachbarin Dana Hönig danke ich für zahlreiche tolle Geschichten; „ist das mein Ernst?“ – Ja, es ist mein Ernst und für ihre Begeisterungsfähigkeit für fast alles.

Bei Dr. Christoph Lederer und Alma Rute möchte ich mich für die Vorarbeiten zu diesem Projekt, insbesondere die Aufklärung der NMR-Struktur, bedanken.

Ein herzlicher Dank geht an Dr. Jonathan Müller, durch den ich überhaupt erst in der Arbeitsgruppe gelandet bin und der mit seiner Begeisterung mein Interesse für die Proteinbiochemie geweckt hat.

Ein riesiges Dankeschön geht an das gesamte Team (inkl. Ehemalige) der AG Bayer, Peter Binz, Tina Gerdes, Gila Schulte-Eickholt, Mina Morzorov, Irina Michin, Dr. Cristina Hartmann-Fatu, Dr. Jennifer Michevec und 1/8 AG Bayer-Mitarbeiter Helmut Tourné für technische Unterstützung, die gute Stimmung und die vielen schönen Unternehmungen.

Zuletzt möchte ich mich bei den temporären AG Bayer-Mitgliedern Basri Adiprasito, Matthias Koch, Tim Düking, Gero Heilmann, Marian Lorenz und Mike Blüggel bedanken, von denen jeder auf seine Art für unterhaltsame und motivierende Situationen gesorgt hat.

10 Lebenslauf

"Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten."

Publikationen

J. W. Mueller, N. M. Link, A. Matena, L. Hoppstock, A. Rüppel, P. Bayer, and W. Blankenfeldt. (2011) Crystallographic Proof for an Extended Hydrogen Bonding Network in Small Prolyl Isomerases. *J. Am. Chem. Soc.*, 133 (50), 20096–20099.

J. van den Boom, F. Trusch, L. Hoppstock, C. Beuck, P. Bayer. (2016) Structural Characterization of the Loop at the Alpha-Subunit C-Terminus of the Mixed Lineage Leukemia Protein Activating Protease Taspase1. *PLoS One*, 14;11(3).

L. Hoppstock, F. Trusch, C. Lederer, P. van West, M. Koenneke, P. Bayer. (2016) NmPin from the marine thaumarchaeote *Nitrosopumilus maritimus* is an active membrane associated prolyl isomerase. *BMC Biol.*, 27;14(1):53.

11 Eidesstattliche Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) f) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Studien zu der thaumarchaealen Prolyl-Isomerase *NmPin* aus *Nitrosopumilus maritimus*“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Lukas Hoppstock befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe entgegenstehen, weiterführen werde.

Essen, den _____

Unterschrift eines Mitglied der Universität Duisburg-Essen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient, bei der Abfassung der Dissertation nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____

Unterschrift des Doktoranden

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) e) + g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den _____

Unterschrift des Doktoranden